

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Toxicología y Farmacología



TESIS DOCTORAL

**Evaluación farmacocinética/farmacodinámica de cefquinoma
en suero y líquido tisular de llamas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Martín Alejandro Himelfarb

Directores

Sonia Rubio Langre
Augusto Matías Lorenzutti

Madrid 2018



TESIS DOCTORAL

EVALUACIÓN FARMACOCINÉTICA/FARMACODINÁMICA DE CEFQUINOMA EN SUERO Y LÍQUIDO TISULAR DE LLAMAS

**Memoria para optar al Grado de Doctor
presentada por**

MARTIN ALEJANDRO HIMELFARB

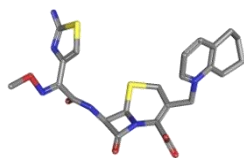
Directores

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Dra. Sonia Rubio Langre

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

Dr. Augusto Matias Lorenzutti



Madrid, 2017

FACULTAD DE VETERINARIA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA (Argentina)

EVALUACIÓN FARMACOCINÉTICA/FARMACODINÁMICA
DE CEFQUINOMA EN SUERO Y LÍQUIDO TISULAR DE
LLAMAS

MARTIN ALEJANDRO HIMELFARB

Madrid, 2017

FACULTAD DE VETERINARIA

Dña Sonia Rubio Langre Profesora de Farmacología de la Universidad Alfonso X el Sabio (Madrid) y D. Augusto Matías Lorenzutti Profesor de Farmacología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba (República Argentina),

CERTIFICAN:

Que la memoria presentada por el Veterinario D. Martin Alejandro Himelfarb, con el título “Estudio farmacocinético / farmacodinámico de la cefquinoma en suero y líquido tisular de llamas”, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el laboratorio de Farmacocinética, de la Cátedra de Farmacología y Terapéutica, del Dpto. de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y en el laboratorio de Farmacología y campos experimentales pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba (República Argentina).

Madrid, Noviembre de 2017

Fdo. Dña Sonia Rubio Langre

Fdo. D. Augusto Matías Lorenzutti

Trabajo que presenta D. Martin Alejandro Himelfarb

para aspirar al Grado de Doctor

Fdo. Martin Alejandro Himelfarb

Madrid, noviembre de 2017

ÍNDICE

I.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
I.1.	CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS	1
I.1.1.	ORIGEN DE LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS	1
I.1.2.	CLASIFICACION TAXONÓMICA DE LOS CAMÉLIDOS	1
I.1.3.	LOS CAMÉLIDOS Y SUS PRODUCTOS	2
I.1.4.	PRINCIPALES CARACTERISTICAS ANATOMO-FISIOLÓGICAS DE LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS	3
I.1.5.	PRINCIPALES PATOLOGÍAS INFECCIOSAS QUE AFECTAN A LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS	5
I.2.	USO RACIONAL Y PRUDENTE DE ANTIMICROBIANOS	7
I.3.	CEFALOSPORINAS	9
I.3.1.	CLASIFICACION DE LAS CEFALOSPORINAS: RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.....	10
I.3.2.	CEFQUINOMA.....	13
I.3.3.	MECANISMO DE ACCIÓN	14
I.3.4.	RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	15
I.3.5.	RESISTENCIA.....	18
I.3.6.	FARMACOCINETICA DE CEFQUINOMA Y OTRAS CEFALOSPORINAS EN DIFERENTES ESPECIES ANIMALES.....	21
I.3.7.	TOXICIDAD DE LA CEFQUINOMA	29
I.3.8.	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO / FARMACODINÁMICO.....	31
I.4.	CAJAS TISULARES	36
I.4.1.	CAJAS TISULARES COMO MODELOS DE ESPACIO INTERSTICIAL	36
I.4.2.	CAJAS TISULARES COMO MODELOS PARA ESTUDIOS DE DISTRIBUCIÓN DE ANTIMICROBIANOS	37
I.4.3.	CONSIDERACIONES FARMACOCINÉTICAS.....	39
II.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	43
III.	MATERIAL Y METODOS.....	49
III.1.	MATERIAL.....	50
III.1.1.	MATERIAL GENERAL UTILIZADO EN LOS MUESTREOS Y EN LA IMPLANTACIÓN DE CAJAS TISULARES.....	50
III.1.2.	CAJAS TISULARES	51
III.1.3.	MATERIALES GENERALES UTILIZADOS EN EL LABORATORIO	51
III.1.4.	EQUIPAMIENTO UTILIZADO EN EL LABORATORIO.....	52
III.2.	MÉTODOS	53
III.2.1.	ETAPA I.....	53

III.2.2. ETAPA II	58
III.2.3. ETAPA III: MUESTREO MICROBIOLÓGICO Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE CEFQUINOMA EN CEPAS REGIONALES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> Y <i>ESCHERICHIA COLI</i> EN LLAMAS ENFERMAS.....	64
III.2.4. ETAPA IV: ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO/FARMACODINÁMICO MEDIANTE SIMULACIÓN DE MONTE CARLO.....	68
III.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	69
IV. RESULTADOS	73
IV.1. EXAMEN CLÍNICO DE LOS ANIMALES	73
IV.2. ETAPA I.....	74
IV.2.1. IMPLANTACIÓN CAJAS TISULARES.....	74
IV.3. ETAPA II: FARMACOCINÉTICA DE CEFQUINOMA EN SUERO Y LÍQUIDO TISULAR EN LLAMAS TRAS LA ADMINSTRACIÓN VÍA INTRAVENOSA, INTRAMUSCULAR Y SUBCUTÁNEA.....	76
IV.4. ETAPA III. MUESTREO MICROBIOLÓGICO Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE CEFQUINOMA EN <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> Y <i>ESCHERICHIA COLI</i> EN LLAMAS ENFERMAS.....	80
IV.5. ETAPA IV: ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO/FARMACODINÁMICO MEDIANTE SIMULACIÓN DE MONTE CARLO.....	82
V. DISCUSIÓN.....	87
V.1. DEL MATERIAL	87
V.2. DEL MÉTODO.....	88
V.2.1. ETAPA I: IMPLANTACION DE CAJAS TISULARES.....	88
V.2.2. ETAPA II: FARMACOCINETICA DE CEFQUINOMA EN SUERO Y LÍQUIDO TISULAR POR VÍA INTRAVENOSA, INTRAMUSCULAR Y SUBCUTÁNEA EN LLAMAS	90
V.2.3. ETAPA III: MUESTREO MICROBIOLÓGICO Y DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACION INHIBITORIA MÍNIMA DE CEFQUINOMA EN CEPAS REGIONALES DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> Y <i>ESCHERICHIA COLI</i> EN LLAMAS ENFERMAS.....	109
V.2.4. ETAPA IV: ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO/FARMACODINÁMICO MEDIANTE SIMULACIÓN DE MONTE CARLO.....	112
VI. CONCLUSIONES	117
VII. BIBLIOGRAFÍA	119
VIII. ANEXO	141
IX. RESUMEN	167

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1. CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

I.1.1. ORIGEN DE LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Los Camélidos se originaron en América del Norte hace 45 millones de años aproximadamente, a partir de un pequeño antecesor de 30 cm de talla (*Protylopus petersoni*) (Stanley *et al.*, 1994). La tribu de los *Lamini*, representada por fósiles del género *Pliauchenia*, se originó entre 9 y 11 millones de años atrás en las praderas del oeste de América del Norte (Harrison, J.A, 1985). En la misma época, hace alrededor de tres millones de años, antecesores de los camélidos de la tribu de los *Camelini* emigraron a Asia por el estrecho de Behring, donde continuó el proceso de evolución y domesticación hasta los camellos y dromedarios actuales. En América del Sur, la separación entre los géneros *Lama* y *Vicugna* ocurrió hace dos millones de años aproximadamente (Wheeler, J.C, 1995), aunque la domesticación tuvo lugar mucho tiempo después. La mayoría de los investigadores aceptan que el origen de la domesticación de los camélidos sudamericanos (CSA) se restringe a los Andes, pero no existe acuerdo en cuanto a la cronología y si existieron uno o varios centros de domesticación (Mengoni G.L., 2008).

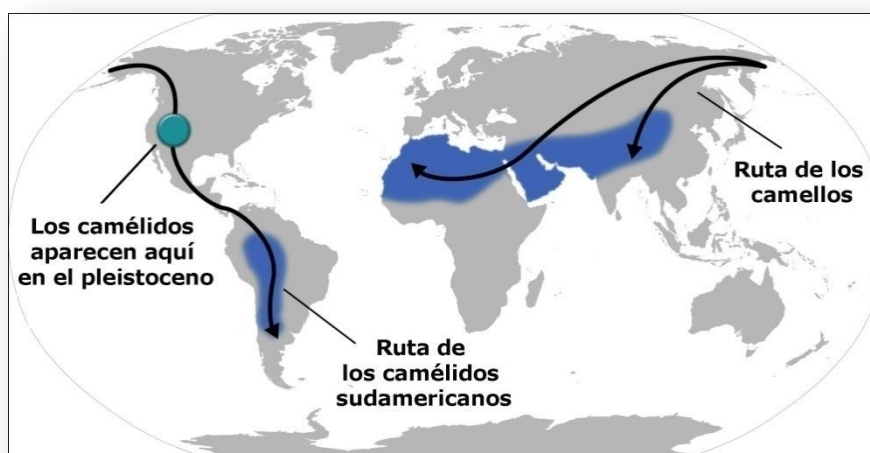


Figura 1: Origen y migración de los camélidos (Pinto *et al.*, 2010).

I.1.2. CLASIFICACION TAXONÓMICA DE LOS CAMÉLIDOS

Los camélidos se clasifican en el Orden Artiodactyla, Suborden Tylopoda y Familia *Camelidae* (Wheeler, J.C., 2006; Fowler, M., 2008). Antiguamente se les conoció con el nombre de “Auquénidos”, término acuñado por Illiger en 1811, pero este nombre ha sido modificado por ser incorrecto, ya que en 1789 Thunberg lo había utilizado para describir un género de escarabajos (Wheeler, J.C., 2006). La familia *Camelidae* está formada por dos tribus: los *Camelini* y los *Lamini* (Stanley *et al.*, 1994; Wheeler, J.C., 1995). La tribu *Camelini* habita zonas desérticas de Asia y África y es conocida como Camélidos del “Viejo mundo”; en cambio la tribu *Lamini* prolifera en América del Sur y se conoce como Camélidos

Sudamericanos o del Nuevo Mundo. Se diferencian de los anteriores, ya que carecen de joroba y son de menor tamaño (Figura 2).

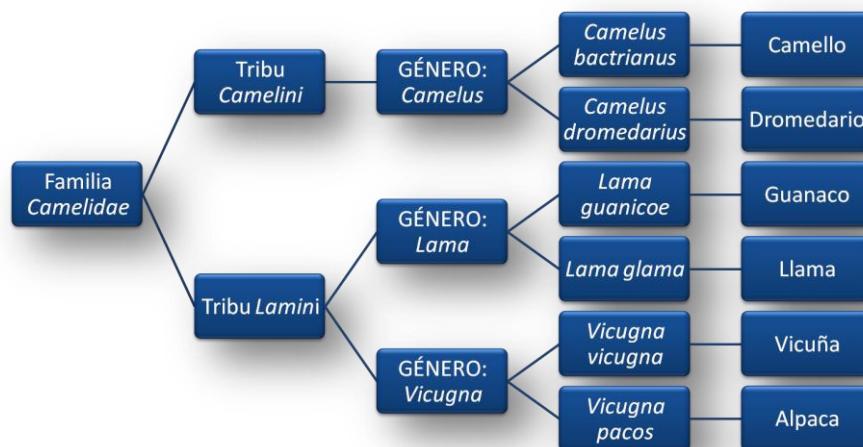


Figura 2: Clasificación taxonómica de los camélidos (Pinto *et al.*, 2010).

Las llamas tienen un peso que puede superar los 150 kg y su alzada a la cruz llega hasta 1,20 m. Existen dos razas, Chaku y K'ara, conocidas también con las denominaciones Lanuda y Pelada, respectivamente. Se diferencian una de otra por la magnitud de la cobertura del cuerpo. Mientras que Chaku tiene mayor cobertura de fibra, incluyendo las extremidades, K'ara tiene una apariencia de mayor fortaleza corporal con poca cobertura de cuerpo y extremidades (Fernández-Baca, S., 2005). No son grupos naturales; se considera que han sido manipuladas por antiguos pobladores de la zona andina. Esto pudo haber ocurrido desde que se domesticaron los guanacos hace unos 7 mil años. Sin embargo, la explosión en su crianza alcanzó su punto máximo durante el imperio Inca llamado “Tawantinsuyo”.

I.1.3. LOS CAMÉLIDOS Y SUS PRODUCTOS

Los Camélidos Sudamericanos constituyen una riqueza pecuaria y genética para las poblaciones andinas; son fuente de fibra, carne, de trabajo y de muchos productos indispensables para la subsistencia de un amplio sector de la población alto andina, destacándose su eficiencia en un ambiente adverso como lo son las frágiles praderas de los páramos andinos de los cinco países donde se concentra la mayor población natural de estas especies; Argentina, Bolivia, Chile, Ecuador y Perú.

Antes de la colonización, los camélidos domésticos estaban ampliamente distribuidos desde las altitudes de los Andes hasta el nivel del mar. Durante la colonización sufrieron el sacrificio incontrolado y fueron desplazados por los animales domésticos introducidos por los europeos (Crosby, A.W., 1986). Como consecuencia, los CSA tanto domésticos como silvestres sufrieron una severa reducción en número y su distribución geográfica se vio drásticamente afectada, quedando reducida a las altitudes del altiplano andino (Wheeler, J.C, 1995).

Los CSA tienen la ventaja de resistir ambientes adversos como el existente en el altiplano andino. Se estima que existen cerca de siete millones de animales en los países andinos: Argentina, Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay y Perú (Fernández-Baca, S., 2005; Raggi, L.A., 2005). De estos, el 51% se encuentra en Perú y el 34 % en Bolivia. Solo en Perú se encuentran las cuatro especies de CSA, siendo este país el que alberga la mayor población de alpacas y vicuñas. La mayor población de llamas se encuentra en Bolivia y la de guanacos en Argentina. El interés en las llamas y alpacas ha aumentado en los últimos años en otros países incluyendo Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda y algunos países europeos como el Reino Unido, Alemania, Italia y Francia (Brown, B.W., 2000; Sharpe *et al.*, 2009). También existen explotaciones de estos animales en España. En la mayoría de estos países se utilizan para la producción de fibra o como animales de compañía.

El rol de los CSA en la seguridad alimentaria es de gran importancia en las poblaciones asentadas en las zonas alto-andinas al considerarse la carne una fuente de proteínas con un bajo porcentaje de grasa, mientras que los excrementos pueden utilizarse como combustible y fertilizante. Pese a sus extraordinarias cualidades nutritivas, la carne, tanto de llama como de alpaca, posee un consumo bajísimo en los medios urbanos. Se estima que el 90% de las alpacas y la totalidad de las llamas se encuentra en manos de pequeños productores de subsistencia de estos asentamientos (Fernández-Baca, S., 2005). Por otro lado, la producción de fibra fundamentalmente la de alpaca, posee una alta valoración en los mercados internacionales por su fina textura.

I.1.4. PRINCIPALES CARACTERISTICAS ANATOMO-FISIOLÓGICAS DE LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Algunas de las particularidades anatómicas y fisiológicas que presentan los CSA probablemente estén relacionadas con su adaptación a las condiciones de escasez de oxígeno y de forrajes en las grandes alturas en las que habitan. En estos animales las arterias pulmonares tienen una pared muy delgada y las arteriolas pulmonares tienen una pared con una única lámina elástica (Harris *et al.*, 1982). Varios estudios realizados en llamas adultas y en sus fetos indican que estos animales están genéticamente adaptados a la hipoxia hipobárica de la altura (Giussani *et al.*, 1999; Llanos *et al.*, 2003 y 2007; Herrera *et al.*, 2008).

Los eritrocitos de los camélidos presentan una peculiar forma elíptica y son muy pequeños (6,5 x 3,3 μm). Esta característica se describió hace más de un siglo y desde entonces la atención de los investigadores se ha centrado en establecer su papel en la adaptación de los camélidos a las condiciones de vida del desierto y de los CSA en concreto, a las de la vida en altura (Fowler y Zinkl, 1989). En los CSA, el conteo total de eritrocitos circulantes es mayor que el observado en otros mamíferos (Ellis, J., 1982; Yamaguchi *et al.*, 1987; Weiser *et al.*, 1992; Fowler, M., 1998). Sin embargo, el volumen del paquete celular es menor debido a su forma y a su menor tamaño (Fowler, M., 1998). Los eritrocitos se orientan en dirección al flujo de la sangre, lo que disminuye su resistencia y facilita su circulación a través de pequeños capilares (Fowler, M., 1998). La concentración media de hemoglobina corpuscular es mayor en los camélidos que en otras especies de interés veterinario,

encontrándose valores de $15,1 \pm 0,45$ g/100 ml (Reynafarje, *et al.*, 1975; Banchemo *et al.*, 1971; Fowler M, 1998).

La hemoglobina de los CSA tiene mayor afinidad por el oxígeno en comparación con la de otros mamíferos (Bartels *et al.*, 1963; Moraga *et al.*, 1996). Esto depende de la afinidad intrínseca de la misma por el oxígeno. La adaptación a largo plazo de los CSA a las condiciones de hipoxia de altura, es decir, los cambios de base genética, implican cambios en la estructura de las moléculas de hemoglobina que aumentan su afinidad por el oxígeno (Weber R.E., 2007). Estos cambios consisten en sustituciones de aminoácidos en los sitios de unión al fosfato (Bauer *et al.*, 1980; Kleinschmidt *et al.*, 1986; Weber R.E., 2007).

El sistema digestivo de los CSA es similar al de los rumiantes. Taxonómicamente los camélidos y los rumiantes se clasifican en dos subórdenes diferentes: Suborden Tylópoda y Suborden Ruminantia, respectivamente. La separación de ambos subórdenes ocurrió muy temprano en el proceso evolutivo, hace 40 millones de años, cuando los progenitores de ambos grupos tenían estómagos simples (Webb, S.D., 1974) y continuaron una evolución paralela desarrollando similitudes de forma separada debido probablemente a la acción de factores selectivos comunes a ambas líneas evolutivas (Webb, S.D., 1974; Fowler, M., 1997).

La anatomo-fisiología del estómago de los camélidos es muy diferente al de los rumiantes. El estómago tiene tres compartimentos que no son análogos al rumen, retículo, omaso y abomaso de los rumiantes (Vallenas *et al.*, 1971; Cummings *et al.*, 1972; Lechner-Doll *et al.*, 1995; Engelhardt *et al.*, 2007). El mismo está constituido por tres compartimentos: el proximal o compartimiento 1 (C-1) que es el más voluminoso (83% del total del volumen gástrico) (Alzola *et al.*, 2004) y que está dividido a su vez, en una porción craneal y otra caudal por un pliegue muscular transversal (Luciano *et al.*, 1980; Engelhardt *et al.*, 2007). El intermedio o compartimiento 2 (C-2) es el más pequeño (6 %) y es la continuación del C-1. El distal o compartimiento 3 (C-3) representa el 11% del volumen gástrico y se origina en el C-2 situado en el lado derecho del C-1 con forma tubular y alargada (Luciano *et al.*, 1980; Engelhardt *et al.*, 2007). Los compartimientos estomacales de los camélidos se caracterizan por la presencia de áreas de mucosa glandular en todas sus superficies (Fowler, M.E., 2010). La fermentación ocurre solamente en los compartimientos 1 y 2, por lo que existe muy poca formación de gas y presencia de borborigmos. En los rumiantes el contenido ruminal está estratificado con una capa de gas dorsalmente, una capa de ingesta sólida en el medio y una capa más líquida y con partículas de menor tamaño en la zona más ventral. En los camélidos, la ingesta es homogénea y más seca. El surco reticular no es tan definido como en los bovinos, ovinos y caprinos. En el neonato, la leche ingerida se dirige al C-1, después al C-2 e igual al C-3.

Los camélidos, en general, poseen una eficiencia superior a los rumiantes con respecto a la extracción de energía y otros nutrientes de forrajes de mala calidad. Ocurre lo mismo con la digestión de las fibras y proteínas, debido a múltiples factores como contracciones cavitarias más rápidas lo que genera una mejor maceración, mezclado y absorción.

En su hábitat natural, los CSA se alimentan del forraje nativo, cuya disponibilidad está sometida a los cambios estacionales. Presentan una alta eficiencia digestiva con alimentos de baja calidad que está relacionada con un mayor tiempo de retención del alimento y más

eficiencia en la extracción de proteína y energía en su tracto digestivo (San Martín y Bryant, 1989; Fowler, M., 1998; Sponheimer *et al.*, 2003). La digestión gástrica es similar pero no análoga a la digestión de los rumiantes (Fowler, M., 1998).

La digestión y absorción intestinal en los camélidos aparentemente es similar a los rumiantes. Los camélidos no poseen vesícula biliar, por lo que la bilis fluye continuamente (Ghezzi *et al.*, 2000). El ciego y colon mayor no funcionan como cámaras de fermentación primarias. El intestino grueso forma un colon espiralado, el cual va disminuyendo en diámetro. La forma característica de la materia fecal (*pellets*) se forma en la mitad del camino espiral. Esta disminución del diámetro intestinal contribuye a la aparición de impactaciones en las llamas. El tiempo de tránsito intestinal varía según el tamaño del mismo pero se sitúa en promedio a los 4 días (Fowler, M., 2010).

I.1.5. PRINCIPALES PATOLOGÍAS INFECCIOSAS QUE AFECTAN A LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

La enterotoxemia es una de las enfermedades infecciosas más importante de los CSA tanto en Norteamérica como en Sudamérica (Thedford y Johnson, 1989; Fowler, M., 1998; Rosadio *et al.*, 2008; Bentancor *et al.*, 2009), siendo una de las principales causas de mortalidad de las crías durante las primeras semanas de vida, alcanzando tasas de mortalidad mayores al 50% (Ramírez y Huamán, 1981; Fowler, M., 1998; Whitehead y Anderson, 2006; Tibary *et al.*, 2006; Rosadio *et al.*, 2008). Ameghino y De Martini (1991), en un estudio sobre las causas de mortalidad en crías de alpacas a lo largo de seis años, determinaron una mortalidad del 44% debida a problemas entéricos, especialmente la enterotoxemia producida por *Clostridium perfringens* (Fowler, M., 1998; Bentancor *et al.*, 2009; Rosadio *et al.*, 2008). La diarrea neonatal es un proceso específico que se caracteriza por la aparición de diarrea, ausencia de fiebre, progresiva deshidratación y acidosis, postración y pérdida de peso hasta caquexia y, frecuentemente, la muerte de los animales. Los enteropatógenos que se han asociado a la diarrea neonatal en los CSA son rotavirus y coronavirus, determinadas cepas de *Escherichia coli*, *Cryptosporidium spp.*, *Giardia spp.* y *Coccidia* (Rosadio y Ameghino, 1994; Cebra *et al.*, 2003; Whitehead y Anderson, 2006; Waite *et al.*, 2008).

En la actualidad, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea en las crías de CSA que habitan en Sudamérica aún no han sido caracterizadas en función de sus factores de patogenicidad (Ramírez *et al.*, 1985). En un estudio realizado en la Patagonia Argentina, se identificaron cepas de *E. coli* del serotipo O26:H11 productoras de toxina shiga (STEC) en guanacos de 2 meses de edad mediante la detección de los genes “stx” (productores de toxina shiga) y “eae” (productores de las lesiones de A/E adherencia y borrado). Se cree que la fuente de contaminación fueron heces de otros animales, como los bovinos, aunque no se descartó que las cepas aisladas fueran residentes normales de los guanacos de esta zona (Mercado *et al.*, 2004).

La mortalidad de las crías de CSA domésticos por neumonía en el altiplano peruano varía entre el 2 y el 27% tanto en alpacas como en llamas. Los procesos neumónicos en los animales neonatos y en los jóvenes son consecuencia de la interacción de múltiples factores (Ramírez, A., 1991). En los CSA, y en las alpacas en particular, los escasos datos sobre la

participación de los distintos agentes infecciosos causales de estos procesos (virus o bacterias) proceden de estudios de seroprevalencia. *Mannheimia haemolytica* es el principal agente etiológico de la pasteurelosis neumónica en el ganado ovino y bovino (Gilmour y Gilmour, 1989; Rice *et al.*, 2008). Se considera que las infecciones víricas, al igual que el estrés y factores ambientales, actúan disminuyendo las defensas de los animales y facilitando el acceso de *M. haemolytica* al pulmón. *M. haemolytica* se aisló de un absceso laríngeo en una cría de alpaca de 10 días de edad en el examen post mortem en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Glasgow (Dwan *et al.*, 2008). También se ha descrito el aislamiento de *M. haemolytica* de un caso de bronconeumonía asociada a Herpesvirus bovino tipo 1 en una llama adulta en Estados Unidos (Williams *et al.*, 1991). En alpacas y llamas en Perú también se han detectado anticuerpos frente a *Mycoplasma spp.* (Hung *et al.*, 1991).

Los factores de riesgo de aparición de procesos neumónicos son todos aquellos que determinan una disminución de las defensas de los animales, facilitando de ese modo el acceso y colonización del pulmón por *M. haemolytica* y otras bacterias. En un estudio sobre la morbilidad y mortalidad predestete en granjas de llamas y alpacas en Ohio (EEUU) los problemas respiratorios fueron poco frecuentes como evento primario (3,8%) pero fueron la segunda causa de morbilidad en los animales que tuvieron un segundo episodio de enfermedad (Sharpe *et al.*, 2009). En el altiplano andino es frecuente la aparición de brotes neumónicos en los meses de septiembre y octubre, coincidiendo con la separación de animales jóvenes de sus madres (destete) y el inicio de la esquila de algunos animales jóvenes. Este manejo condiciona situaciones de estrés en las crías y desencadena brotes de neumonías en estos animales. *Staphylococcus aureus* es un patógeno importante en llamas, y se aísla con frecuencia de la piel y de las heridas causadas por las espinas, las mordeduras y el trauma. *S. aureus* también se aisló de animales con queratoconjuntivitis (Brightman *et al.*, 1981, Fowler M., 2010). Las infecciones bacterianas Gram-positivas en llamas no son comúnmente reportadas, pero los camélidos sudamericanos son susceptibles a infecciones por *Bacillus anthracis*, *Actinomyces pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* (Thedford y Johnson, 1989; Fowler M.E., 1989); *Streptococcus zooepidemicus* se ha aislado de alpacas con un síndrome septicémico y *Streptococcus sanguis* tipo 1; ha sido implicado como causa de aborto en llamas (Thedford y Johnson, 1989; Fowler y Zinkl, 1989; Semalulu y Chirino-Trejo, 1991). Burkhardt *et al.*, (1993) aislaron *Enterococcus spp.* de una llama adulta septicémica. Este caso evidencia que *Enterococcus spp.* es una posible causa de septicemia fatal en llamas. La probable fuente de infección fue una herida, por lo que se indicó un tratamiento agresivo con antibióticos y apertura de la misma.

Por otra parte, *Escherichia coli* puede estar relacionada con diferentes patologías. Las relacionadas íntimamente con este patógeno del sistema nervioso central es la meningoencefalitis, la cual produce altas tasas de mortalidad e importantes pérdidas productivas. Por otro lado la colibacilosis es una patología con alta morbilidad, la cual sin tratamiento genera disminución en ganancia de peso. Las infecciones uterinas se consideran la causa más común de fallo reproductivo en camélidos. Sin embargo, hay datos limitados sobre la incidencia de endometritis y metritis, así como la patogénesis y el tratamiento de infecciones uterinas, en camélidos. Las infecciones del tracto genital pueden conducir a la infertilidad temporal o permanente en el macho y también la hembra. En llamas preñadas, las

enfermedades infecciosas pueden llevar al aborto, así como a la pérdida prenatal y neonatal. El porcentaje de abortos, varía desde un 10 a un 70% y afectan directamente a la posibilidad de los productores de comerciar teques ya sea para consumo, para la reposición de animales adultos o poder producir fibra. La patología cobra importancia ya que la tasa de nacimientos en llamas es normalmente baja (46%) (Thedford y Johnson, 1989, Frank *et al.*, 1998, Mercado *et al.*, 2004, Tibary *et al.*, 2006, Whitehead y Anderson, 2006, Whitehead, C.E., 2009, y Fowler, M., 2010).

Debido a estas situaciones serían de utilidad los antimicrobianos, ya que representan una solución a las importantes pérdidas económicas causadas por enfermedades infecciosas de origen bacteriano. Una posible indicación serían los betalactámicos, específicamente las cefalosporinas, debido a su amplio espectro y baja toxicidad. El uso de antimicrobianos no debe sustituir, en ningún caso, prácticas de manejo adecuadas que redunden en una menor tasa de infecciones y mortalidad.

1.2. USO RACIONAL Y PRUDENTE DE ANTIMICROBIANOS

En la práctica diaria es muy común la implementación de extrapolaciones posológicas de una especie hacia otra y aún más en especies denominadas menores, como es el caso de las llamas. En este caso, se utilizan tal como se hace en bovinos, ovinos e incluso caprinos. Esto se debe a que para muchos antimicrobianos no existen estudios farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD) para poder determinar el régimen posológico adecuado en CSA. Esto supone un alto riesgo, ya que no solo puede llevar al fracaso terapéutico, sino que incrementa factores de riesgo tales como la presencia de residuos en productos de origen animal y en el medioambiente. Sumado a esto puede aparecer toxicidad sobre el animal tratado o peor aún, la presencia de resistencia bacteriana. Es por estas razones que la extrapolación entre especies es arriesgada, debido a que pueden presentar diferencias farmacocinéticas significativas (San Andrés y Boggio, 2007). Existen muchos factores que pueden incidir de manera directa o indirecta en el éxito de la terapéutica antimicrobiana. Estos se pueden resumir en la triada entre el agente infeccioso, el fármaco ATM y las características del animal afectado que recibe el tratamiento (Davis *et al.*, 1968) (Figura 1).

Además de considerar la especie, la raza, el sexo y la edad, debemos tener en cuenta los estados patológicos (como así también el estado inmunitario del individuo). La sensibilidad del microorganismo causante de la infección al antimicrobiano es fundamental, ya que la cura microbiológica solo podrá conseguirse si el antimicrobiano alcanza concentraciones terapéuticas adecuadas en el sitio de infección durante el tiempo adecuado. De esta manera, la elección de la vía de administración dependerá en gran medida de las características farmacocinéticas de cada principio activo, así como también de la extensión de la infección (San Andrés y Boggio, 2007; Asín-Prieto *et al.*, 2015; Guardabassi y Prescott, 2015).

Con el fin de minimizar el posible impacto del uso de antimicrobianos de uso veterinario en la salud pública y animal, varias organizaciones internacionales como la OMS, la OIE, la FAO y la Comisión Europea han destacado en los últimos años la importancia del uso prudente y racional de antimicrobianos en animales. Esto ha sido reconocido por asociaciones profesionales como la Asociación Mundial Veterinaria (WVA), la Federación

Internacional de Productores Agrícolas (IFAP), la Federación Mundial de la Industria de la Salud Animal (COMISA), la Federación de Veterinarios de Europa (FVE) y las Asociaciones Médicas Veterinarias Americanas (AVMA y ACVIM), así como por autoridades nacionales e internacionales. Todas estas entidades han subrayado que el uso prudente de antimicrobianos es importante para salvaguardar la eficacia de los fármacos antimicrobianos en medicina veterinaria y prevenir la aparición y propagación de genes de resistencia indeseables de resistencia en patógenos zoonóticos, así como en las bacterias comensales que se pueden transmitir entre los animales y los seres humanos (Asin-Prieto *et al.*, 2015; Guardabassi y Prescott, 2015).

Para tal fin, se analizaron un conjunto de principios básicos identificados como importantes para ejecutar el uso prudente y racional de antimicrobianos. Estos se centran en el uso de antimicrobianos en la práctica veterinaria y no toman en consideración las medidas gubernamentales tales como la concesión de licencias y el control, que están bajo la responsabilidad de las agencias reguladoras nacionales competentes. En la formulación de este conjunto de principios, se dedicó una atención especial a abordar tanto los beneficios para la salud animal como las consecuencias para la salud pública. La mejor manera de minimizar la necesidad y el uso de antimicrobianos y por lo tanto ayudar a la contención de la resistencia antimicrobiana, es prevenir la enfermedad. Es mejor prevenir que curar, no sólo en relación con la resistencia a los antimicrobianos, sino también desde la perspectiva del bienestar animal y, a largo plazo, desde el punto de vista económico.

El éxito del control de la enfermedad se basa en un enfoque holístico que abarca la ganadería y la gestión, la nutrición, el bienestar animal y la vacunación. Se deben implementar planes de control de infecciones en todas las instalaciones de los animales y en las prácticas veterinarias, incluyendo las que trabajan con animales de compañía. El uso profiláctico rutinario de antimicrobianos nunca debe ser utilizado como un sustituto de la gestión de la salud. La recolección de datos locales sobre la susceptibilidad antimicrobiana es el primer paso para el uso racional de antimicrobianos.

La resistencia a los antimicrobianos debe ser controlada a lo largo del tiempo a nivel del rebaño (ato) o del hospital y los datos deben mantenerse en registros apropiados. Si están disponibles, los datos generados a nivel nacional también son importantes para guiar la elección de los antimicrobianos. La monitorización revela la aparición de nuevas tendencias de resistencia antimicrobiana y es esencial para guiar la elección de fármacos apropiados para el tratamiento empírico. Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos deben realizarse de acuerdo con normas internacionalmente reconocidas. Actualmente se dispone de una amplia gama de métodos estandarizados, como los del European Committee on Antimicrobial Susceptibility (EUCAST), el Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) de los Estados Unidos, la Sociedad Británica de Quimioterapia Antimicrobiana (BSAC), el Comité de Antibiógramas de la Sociedad Francesa de Microbiología (CA-SFM), el Grupo Sueco de Referencia para Antibióticos (SRGA) y el Deutsches Institut für Normung (DIN). Si la práctica veterinaria no cuenta con los recursos humanos y económicos necesarios para ejecutar un servicio de diagnóstico con métodos estandarizados de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, las muestras clínicas deben enviarse a un laboratorio de diagnóstico acreditado. (Ungemach *et al.*, 2006; Constable *et al.*, 2008; Asín-Prieto *et al.*, 2015;

Guardabassi y Prescott, 2015). Debido a estas premisas es importante recomendar el uso racional de los β -lactámicos, entre ellos las cefalosporinas, ya que se indican para el tratamiento de un gran número de patologías.

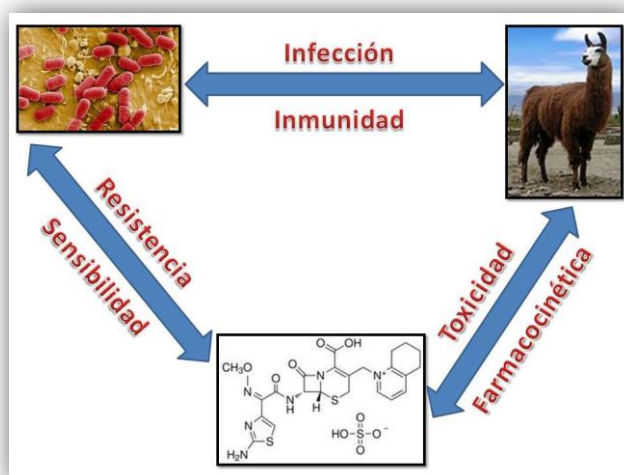


Figura 4: Tríada de Davis: relación entre el antimicrobiano, el microorganismo y el animal para el éxito terapéutico (Davis *et al.*, 1968).

I.3. CEFALOSPORINAS

Las penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactamas y penems se denominan antibióticos β -lactámicos. Se pueden hacer sustituciones en el anillo β -lactámico para propósitos específicos, tales como (1) aumentar la resistencia a β -lactamasas de patógenos clínicamente importantes; (2) mejorar la actividad contra patógenos seleccionados; o (3) asegurar propiedades farmacocinéticas favorables. Así, algunos medicamentos semisintéticos β -lactámicos han sido diseñados para propósitos específicos (Prescott y Dowling, 2013).

Las cefalosporinas de primera y segunda generación fueron introducidas en la década de 1960, debido al comienzo de la resistencia a la ampicilina y carbenicilina (Hornish y Kotarski, 2002).

En las cefalosporinas, el anillo betalactámico está unido a un anillo de dihidrotiazina de 6 miembros que proporciona mayor resistencia a β -lactamasas que el núcleo de penicilina. La molécula de ácido 7-aminocefalosporánico también proporciona más sitios que la molécula de ácido aminopenicilánico para la manipulación en la producción de fármacos semisintéticos. Los cambios en la posición 7 (R1) alteran la estabilidad β -lactamasa y las propiedades antibacterianas, en particular mientras que los cambios en la posición 3 (R2) tienden a alterar la estabilidad metabólica y las propiedades farmacocinéticas. Las cefalosporinas son antimicrobianos semisintéticos derivados de la cefalosporina C, que es producida por el hongo *Cephalosporium acremonium* (Figura 5). Las cefalosporinas propiamente dichas contienen el ácido 7-aminocefalosporánico común de *Cephalosporium acremonium*, mientras que las cefamicinas derivan de las especies de *Streptomyces* (cefotetan, cefoxitina) o son derivados sintéticos producidos por la sustitución del oxígeno por azufre (latamoxef).

Existen diferentes generaciones que reflejan en parte su espectro *in vitro*, sus similitudes estructurales y en cierta medida, el tiempo de introducción al mercado.

I.3.1. CLASIFICACION DE LAS CEFALOSPORINAS: RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Cada antimicrobiano β -lactámico posee sustituciones únicas en su estructura básica que le confieren una afinidad por los diferentes sitios diana (descrito a continuación en el apartado mecanismo de acción) de cada especie bacteriana. Esta variación es la base principal para los diferentes espectros *in vitro* de actividad antibacteriana. En el caso de las bacterias Gram negativas, las sustituciones sobre el anillo β -lactámico también confieren capacidades diferenciales de las cefalosporinas para penetrar a través de la membrana externa y acceder a los lugares de acción (Hornish y Kotarski, 2002).

Las cefalosporinas fueron originalmente introducidas para el tratamiento de infecciones producidas por estafilococos resistentes (productores de β -lactamasas), con la ventaja de que estos fármacos poseían también un espectro de actividad similar contra Gram negativos, tal como las aminobenzilpenicilinas de espectro ampliado. Las alteraciones de las cadenas laterales sobre el núcleo del ácido 7-aminocefalosporánico y el descubrimiento de las cefamicinas condujeron a una creciente estabilidad frente a las β -lactamasas de las bacterias Gram negativas, incluyendo *Bacteroides fragilis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

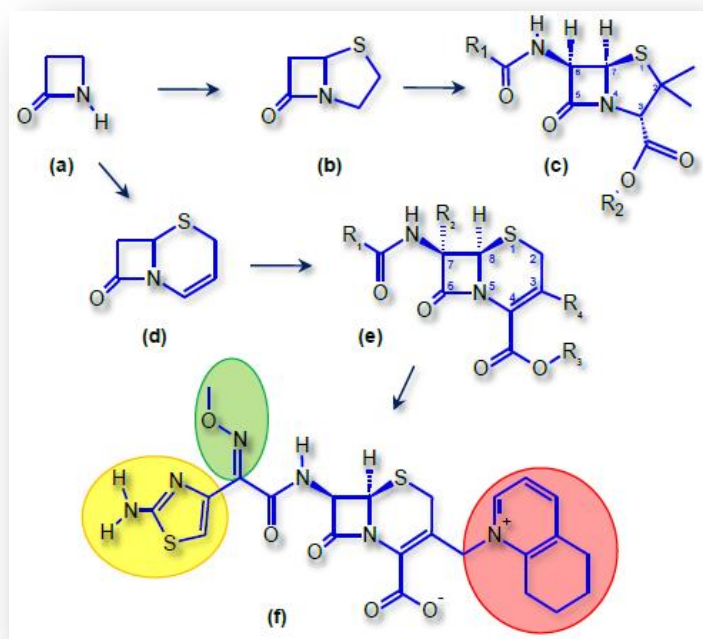


Figura 5: Estructuras β -lactámicas: (a) Anillo β -lactámico; (b) Núcleo penam; (c) Penicilinas; (d) Núcleo cefem; (e) Cefalosporinas y cefamicinas; (f) Cefquinoma, en la que se resaltan los grupos aminotiazolil (amarillo), metoximino (verde) y ciclohexenopiridina (rojo) (De: Litterio, N.J., 2012).

Este incremento en la estabilidad, usualmente, se encuentra asociado a una reducción en la actividad frente a bacterias Gram positivas y variaciones en la farmacocinética (Prescott, J., 2006). Las diferentes generaciones de cefalosporinas (Tabla 1) evolucionaron según las necesidades clínicas, reflejando en parte su espectro *in vitro*, sus similitudes estructurales y, en cierta medida, el momento de introducción en el mercado (Hornish y Kotarski, 2002; Prescott, J., 2006; Papich y Riviere, 2009). Debido a las insuficiencias en la clasificación basada en las generaciones, se ha desarrollado una clasificación extendida basándose en la actividad antimicrobiana, incluyendo la estabilidad frente a β -lactamasas y las propiedades farmacológicas (Prescott y Dowling, 2013)

Las cefalosporinas de 1ª generación son generalmente activas contra cocos Gram positivos, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *S. pseudintermedius*, productores y no productores de β -lactamasas, estreptococos del grupo A y B hemolíticos. En general, las cefalosporinas de esta generación poseen una actividad antimicrobiana limitada contra bacterias Gram negativas, y por otra parte no presentan actividad frente a *Serratia spp.* y *P. aeruginosa* (Prescott y Dowling, 2013)

Las cefalosporinas de 2ª generación presentan el mismo espectro de actividad antimicrobiana que las de 1ª generación, pero se les ha ampliado el espectro frente a diversos microorganismos, tales como *Haemophilus influenzae*, *Bacteroides fragilis* y algunas bacterias Gram negativas, aunque el rango para las mismas es limitado. En general no son activas frente a cepas de *P. aeruginosa*.

Las cefalosporinas de 3^a generación incrementan su actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas, mientras que mantienen una buena actividad contra Gram positivas, aunque son generalmente menos efectivas contra estafilococos susceptibles a las cefalosporinas de 1^a generación. Los compuestos de este grupo son menos susceptibles a las β -lactamasas, en comparación con las cefalosporinas de generaciones anteriores y las penicilinas. Las cadenas laterales oximino, presentes en la mayoría de las cefalosporinas de 3^a generación, fueron introducidas para conferir estabilidad al anillo β -lactámico frente a ciertas β -lactamasas que surgieron a raíz de la presión selectiva ejercida por el uso de la ampicilina, carbenicilina y cefalosporinas de 1^a y 2^a generación en la década de 1960 (Hornish y Kotarski, 2002).

La 4^a generación de cefalosporinas, donde se encuentra la cefquinoma (CFQ), incorpora diferentes grupos activos en su estructura, particularmente un grupo amonio cuaternario en la posición C-3 del núcleo ácido aminocefalosporánico, que le confiere al grupo una mayor potencia frente a una amplia gama de microorganismos e incluso una mayor actividad contra bacterias sensibles a las cefalosporinas de 3^a generación. Tienen un espectro ampliado de actividad contra Gram negativas en comparación con otras clases de las cefalosporinas (El-Gendy *et al.*, 2009).

Tabla 1: Clasificación de cefalosporinas en generaciones basada en la vía de administración y la actividad antibacteriana (modificado Prescott y Dowling, 2013).

Grupo	Características	Ejemplos
1 (Primera generación)	Parenterales; resistentes a β -lactamasas de estafilococos; sensibles a β -lactamasas de enterobacterias	Cefacetrilo, cefaloridina, cefalotina, cefapirina, cefazolina
2 (1^a generación)	Orales; resistentes a β -lactamasas de estafilococos; moderadamente resistentes a β -lactamasas de algunas enterobacterias	Cefadroxilo, cefadrina, cefalexina
3 (2^a generación)	Parenterales; resistente a muchas β -lactamasas	Cefaclor, cefatetan, cefoxitina, cefuroxima, cefamandol
4 (3^a generación)	Parenterales; resistente a muchas β -lactamasas	Cefotaxima, ceftiofur, ceftriaxona, latamoxef
5 (3^a generación)	Orales; resistente a muchas β -lactamasas	Cefetamet, cefixima, cefpodoxima
6 (3^a generación)	Parenterales; resistente a muchas β -lactamasas, activa contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cefoperazona, Cefovecina, cefsudolina, ceftazidima
7 (4^a generación); algunos autores la incluyen en el grupo 6	Parenterales e intramamaria; resisten β -lactamasas de estafilococos, enterobacterias y pseudomonas	Cefepime, cefquinoma, cefpiroma, cefquinoma

Existe una quinta generación de cefalosporinas utilizada en medicina humana, que incluyen a ceftobiprol y la ceftarolina (Kollef, M.H., 2009), con amplia actividad frente Gram negativas y Gram positivas, incluyendo las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y *Pseudomona aeruginosa*.

Todas las cefalosporinas verdaderas (o cefemes) contienen el núcleo ácido 7-minocefalosporánico de *Cephalosporium acremonium*, a diferencia de las cefamicinas que son derivadas de especies de *Streptomyces* (cefotetan o cefoxitina) las cuales son sintéticas y derivados por la sustitución de oxígeno por sulfuro como el latamoxef (Prescott, J., 2006).

El anillo β -lactámico es esencial para la actividad antibacteriana de estas moléculas y que también lo poseen otros ATMs como las penicilinas o penemes (tales como la penicilina, meticilina, cloxacilina, oxacilina, ampicilina, amoxicilina, piperacilina, carbenicilina, y temocilina), los monobactámicos (aztreonam) y los cabapenemes (imipenem y meropenem).

El anillo β -lactámico, también está presente en los inhibidores de β -lactamasas tales como las sulfonas del ácido penicilánico (sulbactam, tazobactam) y el ácido clavulánico, que se utilizan para potenciar la acción de otros β -lactámicos (Hornish y Kotarski, 2002). Dado que el anillo β -lactámico es esencial para la actividad biológica de estos compuestos, la escisión en cualquier punto de este anillo, da lugar a la pérdida completa de la actividad antibacteriana. La sustitución de varios grupos a nivel de R1, R2, R3 y R4 de la estructura básica de las cefalosporinas ha generado una amplia variedad de compuestos con diferencias en el espectro de actividad y en varias propiedades, incluyendo la farmacocinética, disponibilidad por vía oral, la estabilidad a la hidrólisis por β -lactamasas, la afinidad a unión con proteínas y de diferentes sensibilidades químicas. Las diferentes sales que forma, como las bases sódicas y los clorhidratos ácidos se solubilizan mejor en agua que las formas anfóteras. En la CFQ adquieren importancia para la actividad microbiológica los grupos químicos aminotiazolil, ciclohexenopiridina y metoximino.

I.3.2. CEFQUINOMA

La CFQ, como acabamos de comentar, es una cefalosporina de cuarta generación que se utiliza exclusivamente en medicina veterinaria, de amplio espectro y alta estabilidad frente a β -lactamasas producidas por muchas bacterias clínicamente importantes. CFQ está aprobada para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio en bovinos y cerdos, mastitis aguda y pododermatitis (foot root) infeccioso en bovinos, septicemia de terneros y síndrome metritis-mastitis-agalactia en cerdas. Se ha utilizado para prevenir la neumonía grave en los lechones (causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Streptococcus pneumoniae*) (EMA, 2009; Zhang *et al.*, 2014). Además, varios autores recomiendan el uso de CFQ en el tratamiento de la diarrea bovina (Constable P.D., 2004, Constable *et al.*, 2008, Thomas *et al.*, 2006).

Para determinar la elección de CFQ, debemos tener en cuenta la triada anteriormente detallada entre el microorganismo, su sensibilidad y la ubicación del foco infeccioso. Hay diversos trabajos que lo demuestran, ya sea *in vitro* y/o *in vivo* en diferentes especies: en porcinos (Wisselink *et al.*, 2006; Sellyei *et al.*, 2009; Stannarius *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2007), equinos (Thomas *et al.*, 2006), caninos (Ganière *et al.*, 2005), pollos (El-Gendy *et al.*,

2009), bovinos (Ganiere *et al.*, 2005; Sheldon *et al.*, 2004; Palanivel *et al.*, 2005) y bubalinos (Palanivel *et al.*, 2005).

CFQ está autorizado para enfermedades respiratorias porcinas a dosis de 2 mg/kg vía IM cada 24 h durante 3-5 días (EMEA, 1998), así como para el síndrome de disgalaxia post-parto en cerdas (antes síndrome MMA), infecciones respiratorias y necrobacilosis interdigital en bovinos, septicemia causada por *E.coli* en terneros y potrillos e infecciones estreptocócicas en equinos. La indicación se extiende a meningitis y artritis en lechones. Algunos autores (Parlevliet *et al.*, 2009) sugieren la utilización de CFQ vía intrauterina en yeguas (1,5 g/33 ml de diluyente) para tratar la endometritis crónica. La posología es cada 24 h durante 3 días. La CFQ también ha sido utilizada como ATM en el diluyente de semen equino, sin producir ninguna alteración a las diferentes variables seminales (Parlevliet *et al.*, 2006).

I.3.3. MECANISMO DE ACCIÓN

La CFQ, al igual que todos los β -lactámicos y más concretamente las cefalosporinas, ejerce su efecto antibacteriano alterando la síntesis de la pared celular bacteriana con una acción bactericida tiempo-dependiente. El mecanismo de acción deriva de la unión covalente del β -lactámico al sitio activo de las enzimas denominado PBP (*penicillin binding protein*). Esta unión es debida a la similitud estructural de la CFQ por los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (D-alanina-D-alanina) que ensambla las moléculas de peptidoglicano de la pared bacteriana. Además, induce la activación de autolisinas bacterianas que destruyen el peptidoglicano (Mella *et al.*, 2001). Como resultado se produce una lisis osmótica y la consiguiente muerte bacteriana. Sin embargo, algunas de las diferencias en el espectro de acción de la CFQ pueden ser explicadas por las diferentes afinidades del antimicrobiano por las PBPs, debido a que en una bacteria pueden coexistir entre 2 y 8 PBPs con funciones diferentes. Así, el complejo PBP-1 posee una actividad bioquímica de transglicosilasa, la PBP-3 tiene funciones de transpeptidasas y los complejos PBP-4,-5 y-6 de carboxipeptidasas (Mella *et al.*, 2001). Se ha documentado que la inhibición de la PBP-1a y-1b generalmente causa lisis (esta actividad se registra por ejemplo para los carbapenemes), de la PBP-2 da lugar a células redondeadas llamadas “esferoblastos” y la inhibición de la PBP-3 produce formas filamentosas alargadas. En líneas generales los β -lactámicos son afines a las PBP-1,-2 o -3, y en especial para cefalosporinas los grupos de PBP-2 y-3 (Papich y Riviere, 2009).

Para alcanzar el sitio de acción, los β -lactámicos deben atravesar la membrana externa bacteriana y lo hacen a través de unas proteínas denominadas porinas, que se encuentran normalmente presentes en las bacterias, y cuya función es permitir el ingreso de los nutrientes a la célula. Aquellas cefalosporinas que presentan mejor actividad antimicrobiana frente a microorganismos Gram negativos se debe a que logran mayores concentraciones intracelulares, principalmente debido a sus características fisicoquímicas, penetrando en mayor medida por la membrana externa de la pared celular.

I.3.4. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los grupos químicos involucrados en la actividad antibacteriana de la CFQ son el aminotiazolil y, particularmente, el grupo ciclohexenopiridina (Figura 6). La presencia del nitrógeno cuaternario en este último grupo mantiene la carga positiva tanto en condiciones de pH ácido como alcalino. La asociación de esta carga neta positiva con una carga negativa a nivel del C4 del núcleo cefem hace que este ATM se comporte como zwitterión, es decir que en condiciones *in vivo* la molécula mantiene un equilibrio entre sus cargas. Esta característica químico-estructural explica el hecho de que la CFQ presente una penetración a través de las porinas bacterianas superior a sus congéneres de 3ª generación, lo que le permite alcanzar altas concentraciones en el espacio periplásmico de bacilos Gram negativos (Mella *et al.*, 2001; El-Gendy *et al.*, 2009).

Sin embargo, el solo aumento de la penetración intracelular, no explica en forma exclusiva la importante actividad antibacteriana de estos compuestos, particularmente sobre bacterias resistentes a los β -lactámicos. Así, la cefaloridina que estructuralmente también es una molécula dipolar, sin carga neta, con un amonio cuaternario en C3, presenta una penetración intracelular incluso superior a la CFQ; sin embargo, al carecer del radical metoximino no presenta una adecuada estabilidad frente a β -lactamasas, siendo rápidamente degradada. Por tanto, otro aspecto relevante para explicar la mayor actividad de la CFQ sobre bacterias Gram negativas, resistentes a moléculas de 3ª generación, es la estabilidad frente a las β -lactamasas, tanto cromosómica como plasmídica y su afinidad por las PBPs (Mella *et al.*, 2001).

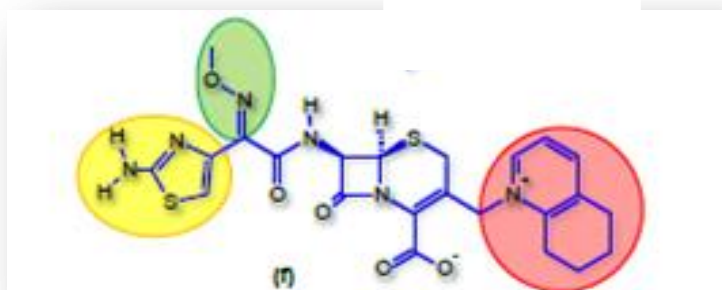


Figura 6: (f) Cefquinoma, en la que se resaltan los grupos aminotiazolil (amarillo), metoximino (verde) y ciclohexenopiridina (rojo) (Litterio, N.J., 2012).

El espectro de actividad antimicrobiana de la CFQ involucra a una amplia gama de bacterias Gram positivas, que incluyen a *Streptococcus spp.*, *S. aureus* (meticilino sensibles) y una actividad superior a las cefalosporinas de 3ª generación frente a bacilos Gram negativos multiresistentes (*Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacteriaceae spp.*, *Pasteurella spp.*, *Citrobacter spp.* y *Serratia marcescens*) y equivalente al de estos compuestos de 3ª generación sobre cepas de bacterias Gram negativas susceptibles como por ejemplo *Actinobacillus equuli* y *Arcanobacterium pyogenes* (Limbert *et al.*, 1991; Böttner *et al.*, 1995; Fung-Tomc, J.C., 1997; Deshpande *et al.*, 2000; Wallmann

et al., 2003; Sheldon *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2006, Zonca *et al.*, 2011; Katsuda *et al.*, 2012).

Por otro lado, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* resistente a meticilina y *Rhodococcus equi* presentaron moderada sensibilidad frente a CFQ según los estudios realizados por Limbert *et al* (1991), Thomas *et al.* (2006) y Aarestrup *et al.* (2010). Los anaerobios Gram positivos como *Peptostreptococcus anaerobius*, *Propionibacterium acnes* y *Clostridium spp* son generalmente sensibles a la CFQ, (Limbert *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 2006). Por otra parte, los anaerobios Gram negativos, tales como *Bacteroides spp* y *Fusobacterium spp.*, presentaron una MIC superior a 100 µg/ml, en el 78,6% de los casos (Limbert *et al*, 1991). Del mismo modo, Sheldon *et al.* (2004) informaron una MIC₉₀ superior a los 32 µg/ml en 22 cepas de *Fusobacterium necrophorum* y *Prevotella melaninogenicus* aisladas de muestras uterinas de vacas postparto con pirexia, metritis y/o endometritis.

En las Tablas 2 y 3 se resumen los valores de MIC₅₀ y MIC₉₀ de diferentes patógenos aislados de porcinos y bovinos en diferentes periodos entre el año 2002 al año 2012 (de Jong *et al.*, 2014; Nedbalcova *et al.*, 2014; El Garch *et al.*, 2016).

Tabla 2: Resultados de la susceptibilidad bacteriana en cepas aisladas de bovinos y porcinos en el período entre los años 2002 al 2006

Microorganismo	2002 - 2006	
	MIC ₅₀ (mg/l)	MIC ₉₀ (mg/l)
Cepas bovinas		
<i>P. multocida</i> (n = 231)	0,03	0,06
<i>M. haemolytica</i> (n = 138)	0,008	0,015
Cepas porcinas		
<i>P. multocida</i> (n = 230)	0,015	0,03
<i>A. pleuropneumoniae</i> (n = 220)	0,008	0,03
<i>S. suis</i> (n = 182)	0,015	0,03

Tabla 3: Resultados de la susceptibilidad bacteriana en aislados de diferentes cepas en bovinos y porcinos desde 2007 a 2011.

Microorganismo	2007		2008		2009		2010		2011	
	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)
Cepas porcinas										
<i>A. pleuropneumoniae</i> (n = 346)	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25
<i>P. multocida</i> (n = 332)	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25
<i>E. coli</i> (n = 217)	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25
Cepas bovinas										
<i>P. multocida</i> (n = 226)	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25
<i>E. coli</i> (n = 160)	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25
<i>M. haemolytica</i> (n = 119)	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25

Nedbalcova *et al.* (2014).

Tabla 4: Resultados de la susceptibilidad bacteriana en aislados de diferentes cepas en bovinos y porcinos desde 2009 a 2012.

Microorganismo	2009 – 2012	
	MIC ₅₀ (mg/l)	MIC ₉₀ (mg/l)
Cepas bovinas		
<i>P. multocida</i> (n = 134)	0,03	0,06
<i>M. haemolytica</i> (n = 149)	0,015	0,03
Cepas porcinas		
<i>P. multocida</i> (n = 152)	0,03	0,06
<i>A. pleuropneumoniae</i> (n = 158)	0,015	0,03
<i>S. suis</i> (n = 182)	0,03	0,06

El Garch *et al.* (2016).

I.3.5. RESISTENCIA

Existe abundante información de la emergencia de resistencia bacteriana frente a las cefalosporinas aunque, de momento, es poca la descrita para la CFQ. El documento EMEA/CVMP/SAGAM/81730/2006-CONSULTATION, publicado en febrero de 2008 por la Agencia Europea del Medicamento, menciona la importancia del control y seguimiento de la emergencia de resistencias frente a cefalosporinas de 3ª y 4ª generación, por el impacto tanto en la salud animal como humana. La preocupación surge de la intensificación del uso de estos ATMs y por el rápido incremento de resistencia en los seres humanos. La evidencia disponible indica que la resistencia a estas generaciones de cefalosporinas también está surgiendo en las poblaciones animales. Si bien se mencionó la importancia estructural de la CFQ frente a las de β -lactamasas, es de destacar que existe una amplia variedad de estas enzimas (Singh *et al.*, 2009) y, si bien la CFQ resiste a la mayoría de ellas (como las de grupo AmpC que incluyen entre otras las β -lactamasas ACC, ACT, CMY, DHA, familia FOX, familia LAT, MIR, MOX), puede resultar susceptible a las denominadas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Las BLEE (TEM, SHV y CTX-M entre otras) son secretadas por bacterias Gram negativas como las pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Jacoby y Munoz-Price, 2005; Michael *et al.*, 2015).

Aunque hay muchas incertidumbres, las consecuencias potenciales de un aumento de la resistencia tipo BLEE en las bacterias que colonizan animales son graves (EMA, 2008). Los genes que codifican BLEE se asocian a menudo con estructuras genéticas que son muy móviles (como plásmidos, transposones, integrones y cassetes génicos) (Jacoby y Munoz-Price, 2005; Helke *et al.*, 2017), permitiendo una rápida diseminación de los mismos, tanto de forma horizontal como vertical, lo que determina un rápido desarrollo de resistencia bacteriana. Los betalactámicos (incluidas las cefalosporinas) son clínicamente importantes para la salud humana y se han realizado varios estudios para evaluar la presencia de genes específicamente asociados a resistencia a este grupo. Se halló el gen de resistencia a betalactámicos bla_{CMY} en *Salmonella spp.* y sus serovares. El plásmido IncA/C también fue hallado en varios aislamientos y confirió un patrón de multirresistencia a diferentes ATM (Helke *et al.*, 2017). Sabia *et al.* (2017), encontraron enterobacterias productoras de BLEE y/o AmpC en 52,2% de aislamientos recogidos de hisopos rectales y 3% de aislamientos obtenidos de muestras de carne de cerdo molida. Teniendo en cuenta los aislados de cerdo, los resultados mostraron que *E. coli* fue el productor BLEE más prevalente y el subtipo TEM-52 fue el más frecuentemente detectado. Por otra parte, no se encontraron enterobacterias productoras de BLEE en carne de cerdo molida; sólo se encontró β -lactamasa tipo AmpC en tres muestras de carne.

Con el objetivo de determinar la probabilidad de desarrollo de resistencia a la CFQ (y otras cefalosporinas de 4ª generación) con el uso clínico de estos agentes, se han llevado a cabo estudios que determinaron las tasas de aislamiento de mutantes resistentes tras exposiciones únicas o repetidas a los mismos. Sin embargo, cabe destacar que estos estudios *in vitro* sólo pueden evaluar la resistencia por mutación cromosómica pero no la adquirida por elementos genéticos, como por las cepas que producen BLEE, dependiendo este último tipo de resistencia de la prevalencia de dichas cepas localizadas en una zona geográfica. Estos diferentes resultados pueden obtenerse utilizando diversos sistemas de vigilancia a nivel de

granjas, por ejemplo, comparando la aparición de BLEE de los aislados de *E. coli* en una granja con un alto consumo de cefalosporinas de 3ª y 4ª generación (Dolejska *et al.*, 2011) o en un estudio que documenta la persistencia de CTX-M en *E. coli* en la flora intestinal de los cerdos tratados por amoxicilina, ceftiofur o cefquinoma (Cavaco *et al.*, 2008). De hecho estas enzimas son las más prevalentes BLEE. Los genes de las enzimas BLEE bla_{CTX-M}, bla_{CTX-M14}, bla_{TEM52} y bla_{SHV-12}, son los mas comúnmente hallados en los animales productores de alimentos, los cuales están alojados en plasmidos de amplio rango de huéspedes. También se pudo observar que la persistencia y la diseminación de genes BLEE puede ocurrir por procesos de coselección (asociación con otros genes de resistencia incluyendo genes de carbapenemasa) (Fung-Tomc, J.C., 1997; Michael *et al.*, 2015).

Además existen otros mecanismos de resistencia a betalactámicos independientes de β -lactamasas, entre los que pueden citarse la disminución del ingreso de ATM a través de la membrana celular externa (Gram negativas) por reestructuración de la conformación de la proteína porina (mecanismo aún no descrito para CFQ pero si para otros ATM β -lactámicos) y la modificación del sitio diana (PBP) (Papich y Riviere, 2009). Este último mecanismo suele ser utilizado por los estafilococos meticilino-resistentes (MRSA) para los diferentes β -lactámicos (Li *et al.*, 2007). El gen *mecA*, que codifica este mecanismo, está localizado como parte del cromosoma cassette de estafilococo, el cual es transferible horizontalmente entre las diferentes cepas de estafilococos presentes en personas y animales (Deurenberg *et al.*, 2007).

De Jong *et al.* (2014), Nedbalcova *et al.* (2014) y El Garch *et al.* (2016), tomaron muestras de granjas porcinas y bovinas entre los años 2002 a 2012 y reportaron que la mayoría de los aislamientos de enfermedades respiratorias en bovinos (causados por *P. multocida* y *M. haemolytica*) fueron susceptibles a antimicrobianos para los cuales el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tiene puntos de corte epidemiológicos. Todos los aislamientos fueron sensibles a amoxicilina/clavulánico. El CLSI no dispone de puntos de corte para cefquinoma y otros betalactámicos, tales como amoxicilina. Las mismas presentaron distribuciones bimodales, sugiriendo el desarrollo de resistencia adquirida en algunos aislamientos. En el caso de cefalexina y CFQ, específicamente, la distribución de las MIC fue claramente unimodal, lo cual indicaría que no existe desarrollo de resistencia adquirida en las cepas estudiadas. También establecen una alta prevalencia de aislamientos de *E.coli* resistentes, con la excepción de las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación (ceftiofur y CFQ), las cuales mantuvieron una alta sensibilidad, similar a lo ocurrido en estudios previos (Catry *et al.*, 2005, DANMAP, 2011 y SVARM, 2013).

Una de las razones de la baja prevalencia de cepas resistentes a la 3ª y 4ª generación de cefalosporinas en comparación con los otros grupos de β -lactámicos que han sido evaluados, teniendo en cuenta los datos de ventas y cartera de medicamentos veterinarios autorizados para la República Checa, es que las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación están autorizadas únicamente para el tratamiento individual (inyectable o intramamario) en el ganado bovino y como inyectables solamente en los cerdos, donde el uso de cefalosporinas de 3ª y 4ª generación se limita principalmente a ciertas infecciones (Nedbalcova *et al.*, 2014).

Por lo tanto, otros β -lactámicos, como las aminopenicilinas, las cuales están disponibles para cerdos en formas farmacéuticas para administración oral se utilizan como medicamento de rebaño para prácticamente todas las categorías productivas y para muchas indicaciones, lo

que puede proporcionar una presión de selección mucho más intensa en comparación con los inyectables de dosificación individual, lo cual es consistente con investigaciones de otros autores (Burow *et al.*, 2013)

En el análisis de la utilización de antibióticos y factores de presión selectiva, también hay que considerar diferentes propiedades entre el microorganismo ensayado, tales como el intercambio de material genético y la naturaleza de estas especies bacterianas desde la perspectiva de los mecanismos de resistencia adquiridos y probabilidad de mutaciones. Desde esta relación podemos establecer que *E. coli* (mejor que *A. pleuropneumoniae*) puede ser considerada como un buen indicador de la aparición de un cambio en los patrones de resistencia (SVARM, 2013; Chantziaras *et al.*, 2013).

La resistencia en patógenos aislados en animales de producción es una amenaza potencial, debido a que reduce la efectividad en el tratamiento antimicrobiano en animales. El grado de riesgo planteado por este peligro es difícil de estimar, en parte porque hay una escasez de información sobre la prevalencia de la resistencia entre los aislados bacterianos causantes de enfermedades de los animales productores de alimentos, junto con el hecho de que el poco conocimiento que se ha generado no lo ha hecho utilizando métodos armonizados, lo que limita la comparación de datos.

La utilización de cefalosporinas en Europa es restrictiva, pero existen diferencias entre los diferentes países. Se han aprobado para su uso cefalosporinas de primera y segunda generación mundialmente, para el tratamiento de mastitis en bovinos. El ceftiofur, una cefalosporina de 3^{ra} generación, se aprobó para el uso en enfermedades respiratorias en cerdos, bovinos y equinos. También fue aprobada para tratar las infecciones mortales neonatales en pollos y pavos. Esta clase de ATMs han sido clasificados de alta prioridad para el riesgo en salud humana. Estos hallazgos resaltan la importancia de monitorizar la emergencia de resistencia para poder detectar nuevos perfiles de resistencia que pudieran comprometer la salud pública, al transferirse desde las granjas hacia las personas (García-Migura *et al.*, 2014).

Cavaco *et al.*, 2008 determinaron que el tratamiento con amoxicilina (15 mg/kg), ceftiofur (3 mg/kg) o CFQ (2 mg/kg) cada 24 h durante 3 días vía IM en cerdos, provocó una selección de cepas de *E. coli* productoras de CTX-M en la flora intestinal. Con la excepción de CFQ, el incremento observado en la cantidad de *E. coli* CTX-M positivas no se debió a la inoculación de la cepa misma, sino a la transformación de cepas endógenas. Además concluyeron que los efectos selectivos de ceftiofur y CFQ persistieron aun después del periodo de retirada, el cual fue de 9 y 5 días respectivamente. Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE), las cefalosporinas de amplio espectro son críticamente importantes en la salud humana y animal (FAO/WHO/OIE, 2007). De acuerdo a la Unión Europea las cefalosporinas son antimicrobianos de segunda elección y solo deberían ser utilizados cuando hay fallos terapéuticos (Burch *et al.*, 2008).

I.3.6. FARMACOCINETICA DE CEFQUINOMA Y OTRAS CEFALOSPORINAS EN DIFERENTES ESPECIES ANIMALES

La farmacocinetica de la CFQ ha sido documentada en diferentes especies. Limbert *et al.*, (1991), describieron la misma en ratones, perros, cerdos y terneros. Ha sido estudiada también en patos (Yuan *et al.*, 2011), conejos (Shalaby *et al.*, 2014), cerdos (Lang *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014), jabalíes salvajes (Liu *et al.*, 2012), equinos (Parlevliet *et al.*, 2009; Winther *et al.*, 2011), ovejas y cabras (El-Hewaity *et al.*, 2014; Dumka *et al.*, 2013), búfalos (Dinakaran *et al.*, 2013) y camellos (Al-Taher A., 2010). En estas especies las vías de administración utilizadas fueron intravenosa (IV), intramuscular (IM) o subcutánea (SC). A continuación se desarrollarán las características farmacocinéticas de las cefalosporinas en las diferentes especies de interés veterinario.

I.3.6.1. Absorción

En general, la absorción oral de cefalosporinas es pobre. Solo algunas moléculas como el cefadroxilo, cefalexina, cefradina y cefaclor se absorben adecuadamente por vía oral (Lavy *et al.*, 1997; Waterman y Scharfenberger, 1978; Campbell y Rosin, 1998). Este fenómeno no ocurre en grandes animales, como por ejemplo, la cefalexina la cual en equinos tiene una biodisponibilidad oral de 5% (Davis *et al.*, 2005). La misma cefalosporina en pequeños animales, concretamente en perros, el valor se sitúa entre 50 y 75% (Lavy *et al.*, 1997) y un 56% en gatos (Wackowicz *et al.*, 1997). Existen formulaciones de cefalosporinas que mejoran su liposolubilidad. Estas están formuladas bajo la forma de ésteres como la cefpodoxima proxetilo, mejorando notablemente su absorción intestinal tras la administración oral en caninos (Campbell y Rosin, 1998). Otra cefalosporina que mejora su biodisponibilidad vía oral es la cefuroxima, que es un éster, y se denomina cefuroxima axetilo, un profármaco que se activa después de hidrolizarse en la mucosa intestinal e hígado en bovinos lecheros (Prescott, J., 2006).

En general la absorción de las cefalosporinas tras la administración parenteral no presenta grandes diferencias y depende de varios factores como la estabilidad del fármaco y la unión a proteínas tisulares. Tras la administración IM o SC, la biodisponibilidad de la mayoría de las cefalosporinas suele ser completa acercándose al 100%, con picos de concentración plasmática entre 30 y 60 minutos post-administración. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se pueden observar ejemplos de diferentes cefalosporinas administradas vía IM en diferentes especies.

Para el caso de CFQ, en la Tabla 6 se muestran parámetros farmacocinéticos relacionados con la absorción y biodisponibilidad.

Tabla 5: Biodisponibilidad intramuscular de diferentes cefalosporinas en diferentes especies animales.

Cefalosporina	Especie	F (%)	C _{max} (µg/ml)	T _{max} (h)
Cefuroxima ^a	Caprinos	88,43±2,11	12,96±0,37	0,51±0,03
Cefalexina ^b	Bovinos	68	-	-
Cefepime ^c	Camellos	91,7±12,35	51,6±6,14	1±0,02
Ceftriaxona ^d	Camellos	93,2±21,4	21,54±2,61	1,03±0,23
Ceftiofur ^e	Llamas	126	5,52±1,13	0,77±0,56
Cefepime ^f	Bufalos	95,3±10,5	30,2±0,09	0,45
Cefepime	Caprinos	69±6 ^g	15,75±2,36	0,5
		86,45 ^h	49,32±10,33	0,8±0,11
Cefepime ⁱ	Equinos	111±22	8,13±1,5	1,31±0,36
Cefepime	Ovinos	86,8±7,5 ^j	31,9±1,5	1,1±0,2
		103±8 ^k	26,34±1,44	0,75
Ceftazidima ^l	Ovinos	86,4±25,7	93,6±6,5	2
Ceftiofur ^m	Bovinos	-	13,9±3,55	0,67 a 3

a: El-Sooud *et al.*, 2000; b: Soback *et al.*, 1988; c: Goudah *et al.*, 2009; d: Goudah A., 2008; e: Drew *et al.*, 2004; f: Joshi y Sharma, 2007; g: Prawez *et al.*, 2010; h: Patani *et al.*, 2008; i: Guglick *et al.*, 1998; j: Ismail M., 2005; k: Patel *et al.*, 2010; l: Rule y Perelli, 1991.

Tabla 6: Biodisponibilidad intramuscular de cefquinoma en diferentes especies animales.

Especie	Dosis (mg/kg)	F (%)	C _{max} (µg/ml)	T _{max} (h)
Camellos ^a	1	-	1,23±0,08	4,25±0,1
Bovinos ^b	1	104 ±7.13	2.34± 0.12	0.78± 0.32
Caprinos ^c	2	57,39±3,4	4,84±0,23	1,5
	2 ^d	103,93±14,7	11,81±0,48	0,34±0,12
Cerdos	2 ^e	95,13±9,93	4,01±0,57	0,28±0,07
	2 ^f	85,13±9,93	3,36±0,54	0,83±0,28
Ovejas ^g	2	98,31±6,06	-	-
Equinos ^h	1	98	-	0.5 – 2

a: Al-Taher A.Y, 2010; b: Limbert *et al.*, 1991; c: Dumka *et al.*, 2013; d: Zhang *et al.*, 2014 e: Li *et al.*, 2008; f: Lu *et al.*, 2007; g: Uney *et al.*, 2011; h: Winther *et al.*, 2011.

I.3.6.2. Distribución

Con respecto a la distribución de las cefalosporinas, se trata de moléculas que se clasifican como ácidos débiles por lo que se comportan como moléculas polares. Se caracterizan por tener una baja liposolubilidad y no poseer buena capacidad para atravesar membranas biológicas. Su volumen de distribución (de manera general) está comprendido entre los 0,2 y 0,3 l/kg y rara vez exceden los 0,5 l/kg.

La CFQ no es la excepción, presentando una distribución limitada, ya que se trata de un ácido orgánico con pKa de $2,71 \pm 0,2$ y su liposolubilidad es baja, lo que la limita a la hora de ser transportada a través de la bicapa lipídica. En caninos el volumen aparente de distribución (en estado de equilibrio) es de 0,2 l/kg, mientras que en equinos, cerdos y bovinos el mismo es de 0,24; 0,23; 0,21 l/kg respectivamente (Limbert *et al.*, 1991; EMEA, 1995; Winter *et al.*, 2011). A pesar de esto, las cefalosporinas tienen buena distribución a líquidos extracelulares, debido a la baja unión a proteínas plasmáticas en animales. La CFQ se une entre un 5 al 15 % variando este pequeño porcentaje en bovinos, caninos, porcinos y ovinos (Limbert *et al.*, 1991; EMEA, 1995; Lohr *et al.*, 2004; Tohamy M.A., 2011), aunque Winther *et al.*, (2011) informan porcentajes de unión a proteínas entre 20 a 30% en equinos.

En el caso de los seres humanos la unión a proteínas es más elevada. Como ejemplo, la ceftriaxona, se une entre un 90 a 95% a las proteínas plasmáticas, mientras que en caninos puede unirse un 25% a bajas concentraciones y un 2% a elevadas concentraciones (Popick *et al.*, 1987; Papich *et al.*, 2014). La cefazolina se une un 85% a proteínas en humanos, pero en caninos solo un 19%, favoreciendo una rápida distribución desde el suero al fluido intersticial (Rosin *et al.*, 1993).

Existe una cefalosporina de 3ª generación (o grupo 6) de uso exclusivo en medicina veterinaria, la cefovecina que presenta una unión del 99% a las proteínas plasmáticas de perros y gatos (Stegemann *et al.*, 2006a y 2006b). La fracción libre que no se une a las proteínas plasmáticas es capaz de filtrarse por el glomérulo. De esa fracción filtrada, una porción puede ser reabsorbida, lo que favorece la semivida de 7 días en felinos y 5 días en caninos. Esta característica mantiene concentraciones tisulares efectivas de, al menos, 14 días para cefovecina en perros y gatos.

La distribución de las cefalosporinas en líquido cefalorraquídeo (LCR) es limitada y las concentraciones logradas corresponden a un 0,5 a 2% de las alcanzadas en sangre. Esto ocurre debido a las características físico-químicas de las cefalosporinas y aún cuando logren llegar al LCR, son extraídas activamente fuera del sistema nervioso central. Esto no ocurre cuando hay casos de meningitis, donde este mecanismo se encuentra interrumpido. Las uniones celulares de tipo estrecha, el transporte de vesículas y por lo tanto el paso de β -lactámicos a través de la barrera hematoencefálica (BHE), se ve favorecida, lo cual redundará en concentraciones del 55% con respecto al pico de concentración plasmática (Dowling y Kruth, 2006). Sin embargo existen algunas cefalosporinas que son excepciones. Las cefalosporinas de 3ª generación como cefaloridina, latamoxef y ceftriaxona, pueden lograr niveles elevados en SNC, siendo menores con cefotaxima, ceftazidima o cefuroxima y variables con el resto.

Las cefalosporinas difunden de manera moderada al sistema respiratorio; la cefquinoma alcanza concentraciones superiores a la MIC₉₀ de patógenos pulmonares como *Mannhemia*

haemolytica y *Pasteurella multocida* (Böttner *et al.*, 1995; Sellyei *et al.*, 2009). Cefoxitina y cefradina alcanzan solo el 20% de la concentración plasmática en secreciones bronquiales (Bergogne-Berezin *et al.*, 1978).

Existen algunos ejemplos de cefalosporinas que alcanzan altas concentraciones en diferentes tejidos. La ceftazidima, ceftizoxima y cefuroxima alcanzan niveles terapéuticos en ojo (Barza *et al.*, 1993). Lo mismo ocurre en el oído medio con cefoperazona, cefalexina, cefotaxima y cefradina (Aslam *et al.*, 2004). Cefapirina y ceftiofur alcanzan gran disposición en líquidos intraperitoneal y sinovial (Brown *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 2009). En piel, la disposición tisular de cefalexina y cefadroxilo es adecuada, siendo un agente del grupo 4 (o 3ª generación), el latamoxef también de elección (Frank y Kunke, 1993).

En general el grupo presenta una distribución moderada para huesos, articulaciones y músculo. Las cefalosporinas de 3ª generación disponen de una distribución menor que otras generaciones. En el caso de osteomielitis, se indica cefazolina. La misma penetra en hueso normal y osteomielítico con concentraciones similares a las alcanzadas en suero (Daly *et al.*, 1982). Se indica comúnmente para procedimientos traumatológicos (Rosin *et al.*, 1993).

Ehinger *et al.* (2006) hallaron entre 0,2 y 0,5 µg/g de CFQ en tejido mamario vacuno, entre las 2 y 6 h postadministración. A diferencia de otros trabajos, este estudio fue realizado *ex vivo* en glándulas mamarias extraídas post-mortem de vacas lactantes y la CFQ fue adicionada al fluido de perfusión simulando un tratamiento sistémico. Es de destacar que no se analizaron muestras de leche, sino de tejido mamario que incluye los capilares por donde circula la CFQ y, por tanto, esto estaría contribuyendo a la detección de concentraciones de este ATM, es decir que no implica que se haya producido paso a través del epitelio capilar.

Como consecuencia de sus sistemas de excreción, los aparatos digestivos y urinarios son focos de concentraciones terapéuticas. Especialmente en orina, su vía principal de excreción, donde excede hasta 100 veces la concentración plasmática. En las Tablas 7 y 8 se comparan diferentes parámetros de distribución de diferentes cefalosporinas, incluyendo la CFQ en diferentes especies animales.

Tabla 7: Volúmenes de distribución de diferentes cefalosporinas en diferentes especies animales.

Cefalosporina	Especie	Dosis IV (mg/kg)	PUP (%)	V _{ss} (l/kg)	Vd _{area} (l/kg)
Cefuroxima ^a	Cabras	20	17	0,64 ± 0,02	0,79 ± 0,01
D-Ceftiofur ^b	Llamas	2,2	-	0,19 ± 0,02	-
Ceftiofur ^c	Alpacas	1	-	0,54 ± 0,18	-
Ceftriaxona ^d	Camellos	10	-	0,1 ± 0,04	-
Cefepime ^e	Ovejas	20	14,8	0,18 ± 0,01	-
Cefepime ^f	Camellos	10	34,5	0,32 ± 0,01	-
Cefepime ^g	Cabras	10	3 - 14	0,14 ± 0,07	-
Cefepime ^h	Ovejas	20	-	0,42 ± 0,02	-
Cefepime ⁱ	Caballos	2,2	-	0,22 ± 0,05	-
Cefepime ^l	Cabras	10	-	0,35 ± 0,03	0,52 ± 0,04
Cefepime ^m	Búfalos	10	33,8	0,42 ± 0,08	0,33 ± 0,04

a: El-Sooud *et al.*, 2000; b: Christensen *et al.*, 1996; c: Drew *et al.*, 2004; d: Goudah A., 2008; e: Ismail M.M., 2005; f: Goudah *et al.*, 2009; g: Prawez *et al.*, 2010; h: Patel *et al.*, 2010; i: Guglick *et al.*, 1998; l: Patani *et al.*, 2008; m: Joshi y Sharma 2007. PUP: Porcentaje de fármaco unido a proteínas plasmáticas; V_{ss} y Vd_{area}: volumen aparente de distribución en el estado estacionario y calculado por el método de área, respectivamente.

Tabla 8: Volúmenes de distribución de cefquinoma en diferentes especies animales.

Especie	Dosis IV (mg/kg)	PUP (%)	Vd_{ss} (l/kg)
Caballos ^a	1	20 - 30	0,21 ± 0,04
Conejos ^b	2	-	0,21 ± 0,03
Terneros ^c	10	<10	0,23 ± 0,13
	2 ^d	-	0,46 ± 0,10
Lechones	2 ^e	-	0,19 ± 0,05
Cabras ^f	2	-	0,37 ± 0,04
Pollos ^g	2	-	0,49 ± 0,05
Potrillos neonatos ^h	1 bid		0,37 ± 0,07
	1 tid		0,35 ± 0,05
	4.5 bid		0,45 ± 0,12
Potrillos 6 semanas ^h	1 bid		0,35 ± 0,06
	1 tid	-	0,35 ± 0,05
	4.5 bid		0,28 ± 0,02
Yeguas ^h	1 bid		0,22 ± 0,04
	1 tid		0,18 ± 0,02
	4.5 bid		0,19 ± 0,05
Ovejas ⁱ	2	-	0,36 ± 0,06

a: Winter *et al.*, 2011; b: Hwang *et al.*, 2011; c: Limbert *et al.*, 1991; d: Li *et al.*, 2008; e: Zhang *et al.*, 2014; f: Litterio, N.J., 2012; g: Xie *et al.*, 2013; h: Smiet *et al.*, 2012 ; i: Uney *et al.*, 2011. PUP: Porcentaje de fármaco unido a proteínas plasmáticas; Vd_{ss}: volumen aparente de distribución en el estado estacionario.

I.3.6.3. Metabolismo

El grupo de las cefalosporinas sufre mínima metabolización y ésta se produce en el hígado. La cefotaxima, cefacetrilo, cefalotina y cefapirina sufren metabolismo por esterasas que separan los grupos 3-acetomixetil del anillo dihidrotiazínico transformándolas en lactonas inactivas. Estos compuestos desacetilados se eliminan vía urinaria, conservando una actividad antibacteriana leve. En el caso de los bovinos y porcinos, ceftiofur es degradado por esterasas, luego sufre una conjugación de la cual surgen diferentes metabolitos: desfuroil-glutation-disulfuro (hígado), 3-3 desfuroil-ceftiofur-disulfuro (en orina) y desfuroil-ceftiofur-cisteina-disulfuro (suero, tejidos y orina) (Jones, R.N., 1989; Hornish y Kotarski, 2002). Como regla general, el grupo posee semividas de 1 a 2 horas, pero algunos fármacos de 3ª generación presentan semividas más prolongadas. Esto puede deberse a la elevada afinidad por las proteínas en el suero, limitada secreción tubular y una mínima biodegradación. Un ejemplo

podría ser el ceftiofur, el cual se metaboliza a un metabolito activo con una semivida de 3 a 4h en bovinos, 4 h en perros y 2,5 h en equinos. Existen otras cefalosporinas de 3ª generación con semividas más prolongadas como la ceftriaxona, cefoperazona, ceftazidima y latamoxef. Estas incorporan en el C3 del anillo β -lactámico unas estructuras de 3 a 4 átomos de nitrógeno (Hornish y Kotarski, 2002; Papich y Riviere, 2009).

En pacientes con lesión renal, se debe ajustar el régimen posológico debido a la importante eliminación urinaria, excepto para aquellos fármacos que se metabolizan o eliminan vía biliar como la cefoperazona, molécula de alto peso molecular y afinidad proteica, que sufre excreción biliar en alta proporción (hasta 75%). Ceftriaxona y latamoxef también se eliminan vía biliar en gran proporción, por lo que están contraindicados en herbívoros de intestino grueso expandido como el equino. Si existe una alteración hepática la dosis no requiere ajuste, ya que la menor excreción biliar se compensa con mayor eliminación urinaria (Prescott, J., 2006; Errecalde *et al.*, 2007).

En el caso específico de la CFQ, sufre una pequeña metabolización y se excreta por riñón (como todos los β -lactámicos). En cerdos se recuperó un 89% de CFQ en orina tras 24 h de la administración IM y un 95% a las 48 h; el resto fue excretado en heces (EMEA, 1998). En terneros entre un 50 y 80% de la dosis fue recuperado en orina en las primeras 4 h, y el 90% dentro de las 24 h; el 5% fue recuperado en heces (EMEA, 1995). En perros, bovinos y porcinos a dosis de 5 y 20 mg/kg vías IV, IM y SC, se obtuvieron valores de semivida de entre 1 y 2 h con un aclaramiento plasmático, en promedio, de 160 ml/kg*h (Limbert *et al.*, 1991). En equinos, la CFQ administrada vía IV a dosis única de 1 mg/kg produjo 103,8 ml/kg*h de aclaramiento plasmático con una semivida de eliminación de 2,17 h. Tras la administración IM de una dosis similar, el aclaramiento fue de 107,4 ml/kg*h y la semivida de eliminación fue de 1,98 h. Los valores obtenidos en equinos son similares a los de bovinos (EMEA, 2003). Esto sugiere, de acuerdo a estos parámetros, que la cinética de eliminación de CFQ es muy similar a la generalidad de otras cefalosporinas.

I.3.6.4. Excreción

Las cefalosporinas son rápidamente eliminadas luego de la administración sistémica. El órgano principal de excreción es el riñón y las concentraciones urinarias de estas moléculas son elevadas. Tras su metabolización, los compuestos desacetilados se eliminan principalmente por orina, conservando cierta actividad antibacteriana. La filtración glomerular y la secreción tubular conforman los principales mecanismos de eliminación de cefalosporinas (Papich y Riviere, 2009). En general, poseen semividas de 1 a 2 horas, pero algunas (particularmente de 3ª generación), pueden tener una semivida más prolongada posiblemente por la limitada secreción tubular, elevada afinidad por las proteínas plasmáticas y mínima degradación.

En cuanto a la CFQ, se excreta, al igual que la mayoría de los β -lactámicos fundamentalmente a través del riñón. Esto se comprobó utilizando el ATM radiomarcado (14C) y el único compuesto identificado positivamente en bovinos tratados fue la CFQ, sin modificaciones, excretado por orina. En terneros un 50-80% de la dosis se recuperó en la orina dentro de las 4 primeras horas y el 90 % dentro de las 24 horas, mientras que un 5% de

la dosis fue de recuperada de las heces (EMEA 1995). En porcinos se recuperó un 89 % de la CFQ en orina tras 24 h de la administración IM y un 95% a las 48 h; el resto fue excretado por las heces (EMEA, 1998). Limbert *et al.* (1991), evaluaron la eliminación de la CFQ en perros, bovinos y porcinos en dosis comprendidas entre 5 y 20 mg/kg por las vías IV, IM y SC y en general se alcanzaron valores de semivida entre 1 y 2 horas con aclaramiento plasmático promedio de 160 ml/kg*h. En equinos se realizó un estudio farmacocinético con CFQ administrada por vía IM e IV a la dosis única de 1 mg/kg. Después de la administración IV el aclaramiento plasmático se estimó en 103,8 ml/kg*h y la semivida de eliminación fue de 2,17 horas. Después de la administración IM el aclaramiento plasmático se estimó en 107,4 ml/kg*h y la semivida de eliminación fue de 1,98 horas. Estos valores son comparables a los obtenidos en ganado bovino (EMEA, 2003). De acuerdo a los valores de estos parámetros, en líneas generales se puede decir que la cinética de eliminación de CFQ en estas especies es similar a la de otras cefalosporinas (Tablas 9 y 10).

Tabla 9: Valores de semivida de eliminación, ($t_{1/2\lambda_e}$), aclaramiento plasmático (Cl) y tiempo medio de residencia (MRT) en diferentes cefalosporinas administradas a diferentes especies animales por vía intravenosa.

Cefalosporina	Especie	Dosis IV (mg/kg)	$T_{1/2\lambda_e}$ (h)	MRT (h)	Cl (l/Kg.h)
Cefuroxima ^a	Cabras	20	1,48 ± 0,037	1,82 ± 0,05	0,37 ± 0,01
D-Ceftiofur ^b	Llamas	2.2	2,19 ± 0,14	3,25 ± 0,24	0,059 ± 0,01
Ceftiofur ^c	Alpacas	1	4,62 ± 1,18	6,8 ± 2,3	0,08 ± 0,02
Ceftriaxona ^d	Camellos	10	2,57 ± 0,52	2,85 ± 0,41	0,11 ± 0,01
Cefepime ^e	Ovejas	20	1,76 ± 0,07	1,82 ± 0,05	0,14 ± 0,01
Cefepime ^f	Camellos	10	2 ± 0,23	2,7 ± 0,08	0,04 ± 0,01
Cefepime ^g	Cabras	10	1,86 ± 0,54	2,7 ± 0,08	0,066 ± 0,01
Cefepime ^h	Ovejas	20	2,45 ± 0,12	2,84 ± 0,09	0,14 ± 0,01
Cefepime ⁱ	Caballos	2.2	2,09 ± 1,25	2,03 ± 1,07	0,07 ± 0,01
Cefepime ^l	Cabras	10	2,71 ± 0,08	2,64 ± 0,09	0,13 ± 0,01
Cefepime ^m	Búfalos	10	2,67 ± 0,29	3,5 ± 0,02	0,086 ± 0,01

a: El-Sooud *et al.*, 2000; b: Christensen *et al.*, 1996; c: Drew *et al.*, 2004; d: Goudah A., 2008; e: Ismail M. M., 2005; f: Goudah *et al.*, 2009; g: Prawez *et al.*, 2010; h: Patel *et al.*, 2010; i: Guglick *et al.*, 1998; l: Patani *et al.*, 2008; m: Joshi y Sharma 2007.

Tabla 10: Valores de semivida de eliminación, ($t_{1/2\lambda_e}$), aclaramiento plasmático (Cl) y tiempo medio de residencia (MRT) de cefquinoma administrada en diferentes especies por vía intravenosa.

Especie	Dosis IV (mg/kg)	$T_{1/2\lambda_e}$ (h)	MRT (h)	Cl (l/Kg.h)
Caballos ^a	1	2,77 ± 1,03	-	0,12 ± 0,02
Terneros ^b	10	1,33 ± 0,41	-	0,13 ± 0,06
Lechones	2 ^c	-	-	0,26 ± 0,08
	2 ^d	11,72 ± 4,35	15,43 ± 2,77	0,09 ± 0,03
Cabras ^e	2	1,61 ± 0,41	1,51 ± 0,15	0,25 ± 0,01
Potrillos ^f neonatos	1 bid	2,40 ± 0,29	3,11 ± 0,40	0,12 ± 0,03
	1 tid	2,18 ± 0,34	3,02 ± 0,48	0,12 ± 0,02
	4.5 bid	2,41 ± 0,51	3,62 ± 0,80	0,13 ± 0,02
Potrillos 6 semanas	1 bid	1,82 ± 0,46	1,96 ± 0,27	0,18 ± 0,02
	1 tid	2,07 ± 0,73	2,06 ± 0,53	0,17 ± 0,03
	4.5 bid	1,53 ± 0,02	1,85 ± 0,12	0,15 ± 0,02
Yeguas	1 bid	2,33 ± 0,64	1,65 ± 0,22	0,13 ± 0,03
	1 tid	1,73 ± 0,46	1,52 ± 0,26	0,12 ± 0,03
	4.5 bid	2,01 ± 0,19	1,67 ± 0,25	0,11 ± 0,03
Ovejas ^g	2	0,78 ± 0,19	-	0,34 ± 0,03
Bovinos cebuinos ^h	1	2,40 ± 0,15	3,11 ± 0,37	0,11 ± 0,02

a: Winter *et al.*, 2011; b: Limbert *et al.*, 1991; c: Li *et al.*, 2008; d: Zhang *et al.*, 2014; e: Litterio, N.J., 2012; f: Smiet *et al.*, 2012; g: Uney *et al.*, 2011; h: Shan *et al.*, 2014.

1.3.7. TOXICIDAD DE LA CEFQUINOMA

La CFQ es un fármaco que posee un amplio margen de seguridad, al igual que el resto de los β -lactámicos. Estos presentan una baja toxicidad aguda (EMA, 1995). En ratones se observó anemia hemolítica tras la exposición a dosis repetidas y crecientes hasta llegar a 2500 mg/kg/día *per os* durante 90 días. No se observaron alteraciones mutagénicas, teratogénicas, carcinogénicas ni inmunológicas (EMA, 1995). En las diferentes publicaciones, donde se ha probado la CFQ, no se han citado toxicidad ni reacciones, así como tampoco efectos colaterales.

Mangal y Sharma (2015) evaluaron la toxicidad de CFQ sobre los parámetros sanguíneos en bucerros. Se les administraron 2 mg/kg vía IM cada 24 horas durante 7 días. Este trabajo evidencia el aumento de uremia y creatininemia a partir del 3^{er} día postadministración. Además se encontró una disminución del número total de eritrocitos y del valor de hemoglobina. El hematocrito también disminuyó significativamente, al igual que los neutrófilos. Otro parámetro sanguíneo afectado fue la tasa de eritrosedimentación, la cual

aumentó significativamente 7 días postadministración. También hubo un aumento considerable en el volumen corpuscular medio, la concentración corpuscular de hemoglobina y la concentración media corpuscular de hemoglobina. En el resto de los parámetros medidos no hubo cambios significativos.

Los autores atribuyen el aumento de uremia y creatininemia a un daño en los túbulos proximales renales y los parámetros sanguíneos modificados se podrían deber a un daño en la medula ósea. Además concluyen que no hubo alteraciones en enzimas hepáticas, fosfatasa alcalina, bicarbonato ni dióxido de carbono.

Maden *et al.*, (2001), realizaron un ensayo similar en perros y determinaron un incremento en las enzimas alanina aminotransferasa, fosfatasa alcalina y en la concentración media corpuscular de hemoglobina, bicarbonato y CO₂ en sangre.

Las indicaciones relacionadas con su uso están dirigidas a casos de hipersensibilidad, como ocurre con cualquier β -lactámico. Otra indicación poblacional es la de correcta posología y evitar el uso preventivo, para disminuir la emergencia de resistencia bacteriana.

1.3.8. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO / FARMACODINÁMICO

La resistencia a los fármacos antimicrobianos es un problema importante que desafía a los médicos veterinarios a proporcionar tratamientos minimizando la probabilidad de propagar la resistencia bacteriana a otros animales, las personas o al medio ambiente. Uno de los factores que contribuyen al surgimiento de la resistencia es la exposición inadecuada durante el tratamiento, lo que resulta en fracasos terapéuticos, la selección y amplificación de mutantes resistentes en la población bacteriana. El uso de dosis demasiado bajas, procesos de distribución escasos y que no se alcancen las concentraciones deseadas en el foco de infección o diana, conjuntamente con administraciones poco frecuentes o la selección de un fármaco poco activo, puede resultar en un fracaso terapéutico al no alcanzar el objetivo farmacocinético-farmacodinámico (PK/PD) adecuado, lo cual puede ser un factor importante que conduce a la aparición de resistencia. "Es especialmente la exposición a concentraciones subóptimas del antimicrobiano el factor más importante en la aparición de la resistencia y su posterior propagación". Por tanto, se han desarrollado estrategias para diseñar regímenes posológicos que alcancen los objetivos PK/PD adecuados (Papich, M.G., 2014). De esta manera, el uso de los principios de PK/PD para la evaluación de compuestos antimicrobianos se ha vuelto común en la literatura veterinaria.

Básicamente, los modelos PK/PD estudian relaciones de exposición del microorganismo al antimicrobiano (Papich, M.G., 2014). En la década del 40' al 50', el Dr. Eagle describió por primera vez el comportamiento tiempo dependiente de la penicilina, como así también el comportamiento concentración-dependiente de la estreptomicina o la bacitracina. En los años 80, se desarrollaron los conceptos modernos de modelos PK/PD en ratones, lo cual fue el punto de partida para el desarrollo de nuevos antimicrobianos, el diseño de nuevos esquemas posológicos para diferentes ATMs ya existentes y el cálculo de puntos de corte de sensibilidad y prevención de aparición de resistencias (Canut-Blasco *et al.*, 2015)

El uso de modelos PK/PD es una herramienta importante para las autoridades reguladoras, ya que les permite promover el uso racional y prudente de antimicrobianos. Los índices de PK/PD se utilizan actualmente para estandarizar puntos de corte determinados por el subcomité del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) en Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana Veterinaria (VAST) (CLSI, 2013). Para conseguir una cura, la concentración de fármaco en plasma o suero debe mantenerse por encima de la MIC, o algún múltiplo de la MIC, durante al menos una porción del intervalo de dosis. Los regímenes de dosificación antibacterianos se basan en esta suposición, pero varían con respecto a la concentración máxima y el tiempo por encima de la MIC que se necesita para una cura clínica. Las relaciones PK/PD de los antibióticos intentan explicar cómo estos factores pueden correlacionarse con el resultado clínico. Varios autores han explicado el uso de estos índices para la dosificación clínica (McKellar *et al.*, 2004; Craig W., 1998; Drusano G.L, 2007 y Aliabadi y Lees, 2002).

Los parámetros PK/PD relacionan parámetros farmacocinéticos *in vivo* obtenidos a partir de concentraciones séricas o plasmáticas, con datos farmacodinámicos de sensibilidad antimicrobiana del patógeno estudiado, incorporando fuentes de variabilidad (farmacocinética y farmacodinámica) intra- e inter-individual (Toutain *et al.*, 2002; Papich, M.G., 2014; Kitamura *et al.*, 2014).

Basándose en que parámetros PK/PD se correlacionen con la eficacia antimicrobiana podemos clasificar a los ATM en tiempo-dependiente y concentración-dependiente (Papich, M.G., 2014; Canut-Blasco *et al.*, 2015). Los fármacos que se comportan como tiempo-dependiente presentan, en general, un efecto post-antibiotico (PAE) de corta duración, mientras que los concentración-dependiente presentan un PAE de mayor duración (Papich, M.G., 2014). En la Tabla 11 y la Figura 7 se muestran los principales parámetros PK/PD utilizados para antimicrobianos tiempo dependiente y concentración dependiente.

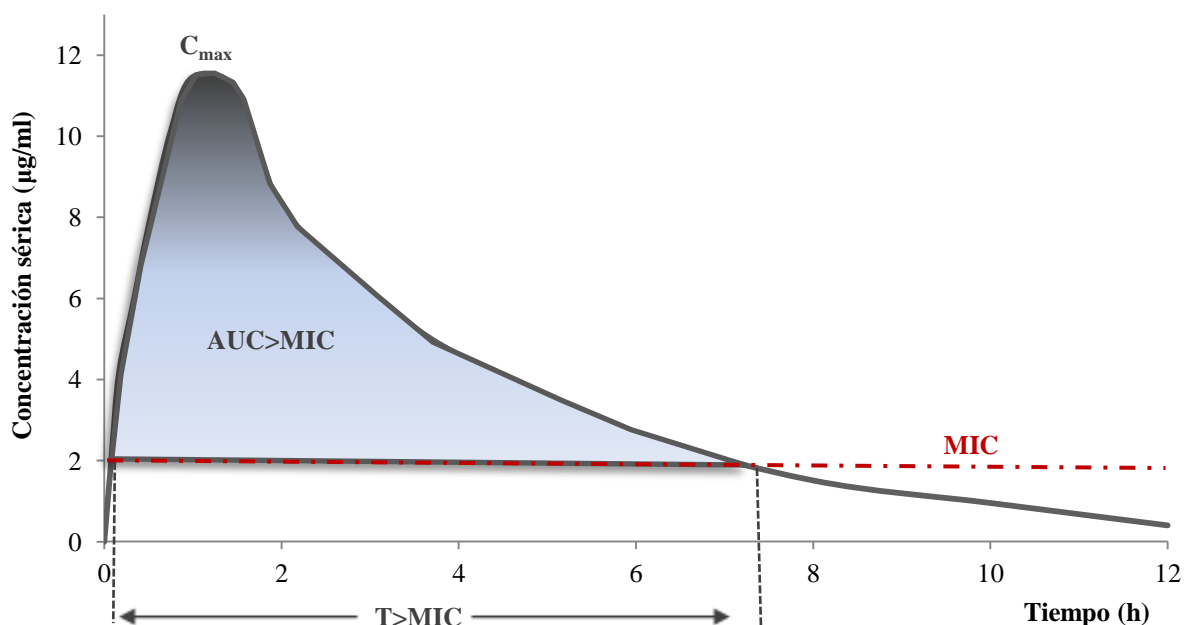


Figura 7: Relación existente entre parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos, determinantes de índices farmacocinéticos/farmacodinámicos, empleados en la predicción de la eficacia de esquemas posológicos a partir de los datos de concentración sérica de cefquinoma vía intramuscular obtenidos en esta tesis.

Tabla 11: Clasificación de los antimicrobianos según su modo de acción, los índices farmacocinéticos/farmacodinámicos empleados para evaluar su actividad y los correspondientes criterios de eficacia.

Antimicrobiano	Actividad	Semivida de eliminación (horas)	Índice PK / PD	Criterio de eficacia
<i>β-lactámicos</i>				
Penicilinas	Tiempo dependiente	1,5 – 2	T>MIC	> 50% (Óptimo 80%)
Cefalosporinas		1 – 1,5		
Carbapenems		0,9 - 1		
<i>Macrólidos</i>				
Eritromicina	Tiempo dependiente	1,5 – 2	T>MIC	> 50% (Óptimo 80%)
Azitromicina		± 15	AUC/MIC	No establecido
<i>Glicopéptidos</i>				
Vancomicina	Tiempo dependiente	5 – 6	AUC/MIC	No establecido
<i>Tetraciclinas</i>				
Doxiciclina	Tiempo dependiente	16 – 18	AUC/MIC	No establecido
Minociclina				
<i>Aminoglucósidos</i>				
Gentamicina	Concentración dependiente	1,5 – 2	C_{max}/MIC AUC/MIC	± 8 - 10
<i>Fluoroquinolonas</i>				
Ciprofloxacina	Concentración dependiente	4 -5	C_{max}/MIC AUC/MIC	≥ 125

Los parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos más empleados se señalan en negrita.

Los antibióticos β-lactámicos como las penicilinas, las aminopenicilinas y las cefalosporinas son bactericidas, pero su acción puede ser más lenta que otros ATM bactericidas, y generalmente se observa un PAE de corta duración. El parámetro PK/PD más utilizado para β-lactámicos es el tiempo por el cual la concentración de ATM se encuentra por encima de la MIC (T>MIC). Este parámetro puede ser representado en horas o más frecuentemente en forma de porcentaje del intervalo de dosificación utilizado. El punto de corte de T>MIC que se encuentra ampliamente aceptado es entre 40-50% del intervalo de dosificación (Turnidge J.D., 1998; Papich, M.G., 2014).

En general, no es recomendable que el T>MIC sea mayor a 80%, ya que al mantenerse por encima de la MIC en forma sostenida durante todo el tratamiento, los β-lactámicos no pueden actuar de manera correcta. Esto se debe a que las bacterias, para poder ser sensibles a los mismos, deben hallarse en fase de crecimiento. Esto quiere decir que la actividad de los β-lactámicos se manifiesta justamente cuando las concentraciones ATM comienzan a disminuir por debajo de la MIC, lo que justifica la necesidad de poseer entre las diferentes administraciones, de concentraciones sub-MIC, justamente para permitirles a las bacterias reiniciar su fase de crecimiento y ser susceptibles a la segunda dosis y así sucesivamente, hasta lograr la disminución de carga bacteriana (Odenholt I., 2001; Picco *et al.*, 2009). El valor de T>MIC puede variar dependiendo de la competencia inmunitaria del animal y de la

clase específica de fármaco. Los carbapenems (por ejemplo: imipenem y meropenem) se usan con creciente popularidad en la práctica de animales de compañía. Estos fármacos exhiben mayor capacidad bactericida, comparado con penicilinas y cefalosporinas y la $T > MIC$ para el tratamiento exitoso puede ser menor para estos fármacos que otros β -lactámicos (por ejemplo, 30% del intervalo de dosis) (Papich, M.G., 2014).

Los regímenes de dosificación de los antibióticos β -lactámicos deben considerar estas relaciones farmacodinámicas. Por lo tanto, para tratar una infección gramnegativa, especialmente grave, algunos regímenes para penicilinas y cefalosporinas requieren administración 3-4 veces al día. Algunas formulaciones de penicilina de acción prolongada se han desarrollado para prolongar las concentraciones plasmáticas (por ejemplo, penicilina procaínica y penicilina benzatínica), pero estas formulaciones rara vez producen concentraciones plasmáticas por encima de la MIC para los bacilos Gram-negativos. Algunas de las cefalosporinas de tercera generación tienen semividas largas y se han utilizado regímenes menos frecuentes para estos fármacos (por ejemplo, cefpodoxime proxetil, cefovecina y ceftiofur). Las formas de liberación lenta de ceftiofur (ceftiofur cristalino ácido-libre) logran un largo $T > MIC$ por liberación lenta del sitio de inyección. Los microorganismos Gram-positivos son más susceptibles a los β -lactámicos que los Gram-negativos y los valores de MICs son más bajos para las bacterias Gram-positivas. Los antibióticos β -lactámicos exhiben un PAE contra *Staphylococcus spp.*, permitiendo intervalos de dosis más prolongados, en comparación con bacterias Gram-negativas. Por ejemplo, la cefalexina y la asociación amoxicilina-clavulánico se han utilizado con éxito para tratar las infecciones estafilocócicas cuando se administran sólo una vez al día (aunque se recomienda administrar dos veces al día para obtener la respuesta máxima).

Los parámetros farmacocinéticos que se incluyen en un modelo PK/PD deben representar con la mayor exactitud posible las concentraciones presentes en el lugar de acción. Es por ello que, idealmente, deberían utilizarse las concentraciones tisulares presentes en el sitio de infección. Sin embargo las concentraciones séricas o plasmáticas son las más utilizadas en los modelos PK/PD, debido a que es sencillo y poco costoso obtener muestras de sangre y generalmente las concentraciones séricas o plasmáticas resultan ser muy similares a las del fluido extracelular, que en la mayoría de los casos es el sitio donde radican las infecciones bacterianas. Por otra parte, no en todos los casos es posible utilizar eficientemente concentraciones séricas de ATMs, ya que en ocasiones las bacterias pueden localizarse en forma intracelular obligada o facultativas o bien existir barreras de exclusión, ya sean fisiológicas o patológicas (abscesos) que no permitan que las concentraciones de fármacos en plasma o suero reflejen de manera fiable las concentraciones alcanzadas en el sitio de infección. Por esta razón se recomienda la utilización de concentraciones provenientes de estos tejidos (McKellar *et al.*, 2004; Papich, M.G., 2014).

I.3.2.1. Análisis PK/PD mediante simulación de Monte Carlo

En el análisis PK/PD, la introducción de la variabilidad farmacocinética interindividual y los datos de población farmacodinámica son esenciales para determinar la eficacia antimicrobiana de un régimen de dosis en una población de pacientes. La simulación mediante el método de Monte Carlo es una herramienta útil para proporcionar ayuda en la optimización de los tratamientos antimicrobianos empíricos, simulando la farmacocinética y la variabilidad farmacodinámica (Drusano, G.L., 2003 y 2004; Asín-Prieto *et al.*, 2015).

Para poder diseñar los regímenes de dosificación de los antibióticos es necesario conocer sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas. Los clínicos se enfrentan diariamente a la selección del régimen de dosificación más adecuado para conseguir el objetivo PK/PD que asegure la máxima probabilidad de erradicación bacteriana y una alta probabilidad de resolución de la infección. Por ello, estrategias como la simulación de Monte Carlo, son de gran valor para guiar a los clínicos en la práctica diaria para una mejor selección de los tratamientos antimicrobianos.

Cuando se considera la variabilidad entre pacientes en el análisis de PK/PD, un enfoque simple basado en un valor único (media) de los parámetros de PK parece un predictor deficiente y se necesita un enfoque basado en simulación que incluya esta variabilidad. En este sentido, la simulación Monte Carlo es una herramienta de modelado estadístico avanzado que permite ampliar el tamaño de la muestra considerando la variabilidad de los parámetros PK y PD en la estimación de los índices PK/PD con el fin de proporcionar predicciones del resultado probable de diferentes terapias o el logro de objetivos terapéuticos (Asín-Prieto *et al.*, 2015).

En cuanto al análisis PK/PD y la simulación de Monte Carlo para antibióticos, se pueden hacer dos estimaciones diferentes del resultado clínico. Por un lado, la probabilidad de alcanzar el objetivo (PTA, según sus siglas en inglés Probability of Target Attainment), definida como la probabilidad de que un valor específico del índice PK/PD asociado con la eficacia del antibiótico se alcanza para un determinado MIC. En otras palabras, corresponde al porcentaje de pacientes simulados con un índice de PK/PD estimado igual o superior al valor relacionado con la eficacia del antibiótico frente a un patógeno con cierta MIC. Este valor de corte se conoce como el objetivo farmacodinámico. Por otro lado, la fracción acumulada de respuesta (según sus siglas en inglés Cumulative Fraction of Response CFR), definida como la probabilidad de que el régimen de dosis alcance un punto de corte PK/PD determinado, teniendo en cuenta la distribución total de MIC de la población bacteriana (Canut-Blasco *et al.*, 2015). Esta probabilidad de alcanzar el objetivo farmacodinámico (PTA) se define como la probabilidad de que un valor específico del índice PK/PD asociado con la eficacia del antibiótico se alcance a una cierta MIC. Se considera que la PTA y CFR deben ser mayores al 90% para que un esquema terapéutico sea considerado adecuado (Alfaro *et al.*, 2004; Nicola y Casellas, 2012; Asín-Prieto *et al.*, 2015; Canut-Blasco *et al.*, 2015).

En otras palabras, debe entenderse como la probabilidad esperada de éxito de un régimen de dosificación contra bacterias en ausencia del valor específico de MIC, y por lo tanto, se utiliza la distribución de la población de MICs.

Este concepto tiene en cuenta las variaciones inter-individuos en cuanto a la diversidad de curvas concentración vs tiempo que se logran ante una misma dosis de ATM y por ende, en los valores PK que se utilizan en los índices PK/PD (es decir la variabilidad en C_{max} , el AUC_{0t} y las concentraciones a diferentes tiempos entre dosis). Entonces, se puede calcular la probabilidad de que en una población heterogénea de individuos se alcance el índice PK/PD para cada esquema terapéutico.

I.4. CAJAS TISULARES

Para establecer la farmacocinética de un antimicrobiano, además de los parámetros plasmáticos, se deben incluir datos de penetración tisular, lo cual es necesario para el establecimiento de los esquemas posológicos de uso clínico. Las cajas tisulares se usaron por primera vez en 1963 por A.C. Guyton, para estudiar la fisiología y composición del líquido tisular. En la farmacología veterinaria, el modelo de cajas tisulares (CT) se ha usado para estudiar la integración PK/PD de los antimicrobianos en diferentes especies, entre otras, cerdos (Ding *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014), ponies (Voermans *et al.*, 2006), terneros (Greko *et al.*, 2002 y 2003), conejos (Rule *et al.*, 2010), camellos (Aliabadi *et al.*, 2003), perros (Walker *et al.*, 1990), cabras (Aliabadi y Lees, 2001) y gatos (Pelligand *et al.*, 2011).

Las cajas tisulares son dispositivos huecos perforados que se implantan subcutáneamente (Adam *et al.*, 1978); también se han colocado en la cavidad peritoneal, próstata (Eickenberg *et al.*, 1976b) y en riñón (Eickenberg *et al.*, 1976a). Después de la implantación, las mismas se vascularizan y el tejido formado por vasos sanguíneos penetra por los orificios del dispositivo. El fluido que se acumula dentro de la CT se considera que está en continuidad con el líquido intersticial y puede ser aspirado con una técnica de extracción percutánea con el fin de obtener muestras (Clarke, C.R., 1989).

I.4.1. CAJAS TISULARES COMO MODELOS DE ESPACIO INTERSTICIAL

El intersticio de la mayoría de los tejidos blandos consiste primariamente en una mezcla heterogénea de fibras colágenas, filamentos de proteoglicanos y fluido intersticial. La mayoría del mismo está contenido entre los filamentos de proteoglicanos para formar el gel tisular y solo una pequeña parte de este fluido existe como “riachuelos” y vesículas de fluido libre (Guyton, A.C., 1981). La naturaleza gelatinosa del material extracelular y la inaccesibilidad de este compartimiento hacen restrictivo el estudio de su fisiología; por esta razón la creación de un compartimiento con fluido artificial, el cual está en íntima comunicación con el intersticio, provee un método conveniente para obtener muestras representativas de dicho líquido intersticial.

Un análisis comparativo del fluido obtenido de las CT de titanio implantadas vía SC y el líquido tisular obtenido por la técnica de parafina líquida reveló que ambos fluidos contenían mayores niveles de potasio que el suero (Haljamae *et al.*, 1974). Lo mismo ocurrió con el sodio y el cloro. En contraste, Calnan *et al.* (1972), reportaron niveles de potasio significativamente menores y de cloro más alto en las CT, comparado con el suero, al igual que Bengtsson *et al.* (1984). Por el contrario, los niveles de calcio y magnesio fueron más

bajos en las CT que en el suero. No obstante, los desequilibrios entre la concentración de electrolitos en el suero y las CT, así como la presencia de glucosaminoglicanos (GAG) y otras sustancias, sugieren que el líquido tisular no es simplemente un ultrafiltrado del suero, sino un fluido dinámico afectado por el ambiente interior del intersticio estudiado (Bengtsson *et al.*, 1984).

A pesar del considerable efecto de gradiente de pH en la difusión de solutos (los cuales casi siempre son ácidos o bases débiles) no ha habido uniformidad en los resultados del equilibrio acido-base de las CT. Calnan *et al.* (1972) no encontraron diferencias de pH entre el líquido tisular y la sangre. Clarke, C.R. (1989) realizó un estudio en vacas y demostró que el pH en las CT subcutáneas era consistentemente más bajo que en la sangre. Esta observación se explicó por la alta pCO₂ medida en la CT, de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log ([\text{HCO}_3^-] / 0,03 \text{ pCO}_2)$$

donde el pH es inversamente proporcional a la pCO₂.

La alta pCO₂ de la CT puede ser explicada por la larga distancia que existe entre los capilares de la CT para que se produzca la difusión de moléculas.

Por otra parte, las concentraciones de proteínas totales y albúmina en el líquido tisular son más bajas que en sangre y van descendiendo a medida que pasa el tiempo tras la implantación de la CT. En un primer momento, después de la implantación, la concentración de proteínas es alta, coincidiendo con el edema producido por la manipulación quirúrgica. En este periodo se produce una extravasación proteica, la cual va disminuyendo a medida que se regenera la circulación y aumenta la integridad capilar. Esto, junto con la remoción de las proteínas, da lugar a una pérdida proteica progresiva en el líquido tisular, hasta niveles de un 50% de la concentración plasmática (Barza, M., 1981).

I.4.2. CAJAS TISULARES COMO MODELOS PARA ESTUDIOS DE DISTRIBUCIÓN DE ANTIMICROBIANOS

La terapia antimicrobiana exitosa depende del logro de adecuadas concentraciones del ATM en el sitio de la infección. Excepto en casos de septicemia o infecciones en el sistema hematopoyético, los patógenos bacterianos residen principalmente en el espacio o fluido intersticial y con menor frecuencia en localizaciones intracelulares. Por lo tanto, una estimación precisa de las concentraciones de ATM en el líquido intersticial es necesaria para establecer un régimen terapéutico correcto (McKellar *et al.*, 2004; Papich, M.G., 2014).

Se podría hacer una extrapolación entre las concentraciones plasmáticas y las tisulares, pero puede dar lugar a errores. Otra opción es tomar muestras de biopsias de diferentes tejidos a diferentes tiempos, pero eso conlleva una técnica muy invasiva y produce malestar o incomodidad al animal. También se podrían realizar estudios de depleción de residuos y analizar a diferentes tiempos los niveles del fármaco en los tejidos diana (Ziv *et al.*, 1982).

Otra posibilidad es recurrir a las CT que presentan ventajas sobre las anteriores, por ser una técnica mínimamente invasiva, no necesita el sacrificio de los animales, ni la realización de biopsias seriadas, con el estrés que ello significaría para los animales. Además, el número

de animales implicados es bajo y el procedimiento de implantación es realizado bajo anestesia general y local. Esto garantiza un tratamiento ético del paciente al poder controlar su dolor de manera eficaz (Ziv *et al.*, 1982).

Las CT son una opción válida para estudiar la penetración de los ATM, ya que su volumen relativamente grande permite el muestreo repetido, considerado esencial para los estudios farmacocinéticos. El hecho de tomar muestras de una misma CT puede interferir con la tasa de equilibrio del fármaco entre los compartimientos vascular y la CT, debido a que la tasa de entrada a los diferentes compartimientos podría no compensar la pérdida de fluido debido al muestreo repetido; este problema potencial puede ser evitado implantando múltiples CT y tomando muestras de cada CT una sola vez (Ziv *et al.*, 1982).

Las CT pueden variar en su tamaño, forma y composición. Los compuestos pueden ser metacrilato, PVC, acero inoxidable y plásticos siliconados. La composición de la misma va a determinar la reacción tisular alrededor del dispositivo y por lo tanto la tasa de penetración del fármaco. De esta manera, los agentes farmacológicos difundirán muy lentamente a las CT que poseen un encapsulamiento denso y además estarán pobremente vascularizadas. Las diferentes formas utilizadas varían desde esferas perforadas (usualmente pelotas de golf para prácticas o de tenis de mesa) a cilindros perforados o incluso espirales de acero inoxidable. El rol de la forma es importante cuando se considera la influencia de la forma en la tasa del área de difusión al líquido tisular (Clarke, C.R., 1989).

El tipo de reacción tisular que ocurre dentro y alrededor de la CT parece ser independiente de la forma y la composición. Inmediatamente después de la implantación, la CT se llena con sangre extravasada con coágulos (Guyton *et al.*, 1971). La cantidad de eritrocitos decrece rápidamente después de la implantación. El aire remanente en la CT, después de la implantación, se absorbe entre 7 y 9 días. En el transcurso de unas pocas semanas después de la implantación, comienza el crecimiento del tejido conectivo a través de las perforaciones para formar un revestimiento altamente vascularizado (Bengtsson *et al.*, 1984). En este momento se pueden visualizar células inflamatorias. A medida que pasa el tiempo, el tejido va incrementado su contenido de colágeno, haciéndose más grueso y denso, hasta que las CT se encapsulan debido a una masa fibrosa compuesta por colágeno, fibroblastos y fibrocitos (Calnan *et al.*, 1972; Ryan, D.M., 1978); también el tejido fibroso se calcifica (Bengtsson *et al.*, 1984). La infiltración celular inflamatoria dentro de las CT refleja la progresión desde un proceso agudo a uno crónico proliferativo. Inicialmente, los polimorfonucleares predominan, pero al cabo de unas semanas después de la implantación, los mononucleares se vuelven más numerosas. Este cambio está acompañado por una disminución del total de células blancas (Tight *et al.*, 1975).

Los ATM ácidos se unen fundamentalmente a la albúmina. Esta unión hace que su transporte a través de la membrana capilar sea muy lento y por lo tanto permanecen secuestrados en el compartimiento con la concentración proteica más alta. La reversibilidad de la unión proteína-fármaco asegura un equilibrio en la concentración en estado estacionario del total del fármaco entre los dos compartimientos, que está en proporción a la concentración de proteínas en los mismos, asumiendo que no existen otros factores (como ejemplo: atrapamiento iónico).

Chisholm *et al.* (1976) evidenciaron la influencia de la unión a proteínas de los ATM, comparando la penetración de dos penicilinas con diferente grado de unión, como son la ampicilina con un 17% y la cloxacilina con un 97%. El resultado fue unos mayores niveles de ampicilina en la CT como consecuencia de su mayor fracción libre (no unida a proteínas plasmáticas). Observaciones similares fueron realizadas con cefaloridina (39,5% de unión a proteínas plasmáticas), cefazolina (92,5% de unión a p.p.) y cefamandol (88% de unión a proteínas) en conejos vía IM. La actividad de cefaloridina fue detectada más rápidamente y alcanzó niveles más altos que las otras 2 cefalosporinas en las primeras 4 h. Si bien un alto nivel de unión a proteínas no necesariamente excluye a un ATM del espacio intersticial, como demostraron Waterman *et al.* (1976), ya que los niveles de cefazolina, en CT de polipropileno multiperforadas, fueron más altas que los de cefaloridina. De todas maneras, los niveles del fármaco de la fracción no unida son más relevantes para la eficacia terapéutica, teniendo en cuenta que la fracción unida a proteínas no tiene actividad antimicrobiana (Barza, M., 1981).

I.4.3. CONSIDERACIONES FARMACOCINÉTICAS

Las CT son una continuidad del espacio intersticial. Esto se ha confirmado con las mediciones del pH, composición electrolítica y cantidad de proteína medidas en el líquido tisular. Clarke, C.R. (1989) intentó caracterizar la naturaleza de la barrera de difusión entre la sangre y el líquido tisular midiendo la tasa de penetración de tres compuestos endógenos: urea, creatinina y albúmina, y sugirió que las características de permeabilidad de la barrera difusional que separa la sangre del líquido tisular era similar a las de las paredes de los capilares endoteliales y que las CT forman parte del verdadero espacio tisular. Aunque las moléculas más pequeñas logran penetrar al líquido tisular, existe un periodo de retraso hasta alcanzar el estado estacionario. Por otro lado, Ryan, D.M. (1978) concluyó que la comunicación dinámica entre la sangre y el líquido tisular puede ser menor que el de la sangre y el líquido intersticial.

Zhang *et al.* (2014) utilizaron un modelo de CT para evaluar la relación PK/PD de CFQ en cerdos, después de una dosis IV e IM. Se evidenció que las curvas de concentración de suero y líquido tisular de CFQ fueron significativamente diferentes. Una explicación potencial podría ser que las características de CFQ, hidrólisis y zwitteriones y la diferencia de pH entre el suero y el líquido tisular puede haber influenciado en la ionización y difusión cuando atraviesa las membranas (Araujo *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta el gran volumen relativo, su bajo área de intercambio y la poca vascularización existente en las CT, este modelo ha sido considerado específicamente como un compartimiento profundo y periférico (Clarke, C.R., 1989). De todas maneras, el fenómeno de penetración del fármaco no puede ser explicado de forma completa por la información PK/PD obtenida en un modelo de CT. También debería ser tenido en cuenta la composición del líquido tisular, ya que la misma está influenciada por los cambios dinámicos del muestreo repetido, el cual puede haber producido un efecto de dilución en la concentración del fármaco (Pelligand *et al.*, 2011).

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Argentina es reconocida por su sistema extensivo de producción de bovino, que requiere amplias extensiones de tierra y a su vez una gran riqueza productiva, premisas que se cumplen en la denominada pampa húmeda. Sin embargo, casi un 60% de su superficie (el monte occidental, los altiplanos del noroeste, las tierras centrales, la pampa semiárida y la meseta patagónica) se halla bajo condiciones de aridez, altitud elevada, baja cantidad de precipitaciones y problemas de suelos, con sistemas agropecuarios deficientes que no permiten este tipo de explotación. Debido a esto, se plantea la necesidad de incorporar una ganadería acorde con ese tipo de terreno y que además mantenga las características medioambientales de la región dentro del concepto de desarrollo sostenible. Entre las especies domésticas disponibles que podrían llegar a adaptarse a las condiciones ambientales figuran los CSA. Esto no impide que los CSA no puedan adaptarse a climas mediterráneos, donde cohabitan con bovinos. Es más, hoy en día, las producciones se han diversificado y muchos productores de bovinos (de manera adicional a su producción principal), se han interesado en los CSA de manera significativa. Otra aplicación de las llamas es su empleo como animal doméstico (*caddie* o animal de carga) o incluso como mascotas debido a su alta docilidad.

Sin embargo, debido a que la sanidad de los CSA de dichas explotaciones, en general, es deficiente, se evidencian una serie de enfermedades que disminuyen la producción, no haciéndola rentable. Los problemas sanitarios de índole infecciosa involucran a los aparatos respiratorio, digestivo, reproductor y septicemias en crías (tekes). La aplicación de antimicrobianos conlleva una reducción de pérdidas económicas y un incremento del bienestar animal; aunque hay que tener en cuenta que el uso indiscriminado o no racional de estos agentes puede generar problemas como falta de eficacia, presencia de residuos en la carne y vísceras y un incremento en la aparición de resistencias bacterianas, que no sólo repercuten en los animales sino también en la población humana.

Por otra parte, la ausencia de datos cinéticos no permite establecer los tiempos de aclaramiento farmacológico, ni por tanto, el tiempo de espera previo al sacrificio, lo que aumenta el riesgo de presencia de residuos en los productos de consumo y una falta de control sobre el impacto medioambiental de las excretas procedentes de los animales tratados.

Una opción terapéutica eficaz frente a las patologías bacterianas de frecuente aparición en las llamas son los β -lactámicos. En el caso de este trabajo de tesis se eligió la cefquinoma (CFQ), una cefalosporina de 4ª generación de uso exclusivo en veterinaria, con actividad bactericida frente a una amplia variedad de microorganismos Gram positivos y negativos, y resistente a la inactivación por β -lactamasas, que ha sido un factor substancial limitante a la terapéutica con cefalosporinas de generaciones anteriores. La CFQ, al igual que el resto de β -lactámicos, interfiere con la síntesis de peptidoglicanos de la pared celular, tras la interacción con las proteínas fijadoras de penicilinas (PBPs). Sin embargo su mecanismo de acción se ve fortalecido por sus propiedades físico-químicas; por un lado se comporta como *zwitterión*, cualidad que favorece el ingreso inmediato a través de membranas bacterianas, inclusive porinas de la pared celular. Por otro, la introducción de un grupo metoximino-aminotiazolil en posición siete de la cadena lateral incrementa la afinidad por las PBPs y extiende el espectro,

fundamentalmente sobre bacterias Gram negativas, en tanto los grupos polares incorporados en posición tres intensifican la actividad sobre estreptococos y *Pseudomonas*.

Las indicaciones de la CFQ abarcan las enfermedades producidas por patógenos sensibles a la misma, que afectan al tracto respiratorio, digestivo, y reproductor o causantes de septicemia, entre otras patologías. Sin embargo, la mayoría de estos estudios de eficacia están realizados en especies que no incluyen a las llamas. Clásicamente las recomendaciones terapéuticas para una especie rumiante se podía extrapolar al resto de ellas, pero numerosos trabajos han puesto de manifiesto las importantes diferencias entre especies, que hacen necesarios estudios individualizados para reducir o minimizar los fallos terapéuticos, los efectos tóxicos o el aumento de resistencias. A su vez tampoco disponemos de datos sobre como alcanza la CFQ el líquido intersticial, un dato relevante, ya que la mayoría de las infecciones se localizan en ese espacio. Una manera científica y éticamente aceptada es la implantación de cajas tisulares, las cuales permiten estimar unas concentraciones que se correlacionan con la llegada del fármaco al intersticio, a través de la extracción del líquido tisular.

Tradicionalmente, para evitar estos problemas se llevaban a cabo una serie de estudios farmacocinéticos (PK) que permitían conocer las concentraciones del fármaco en la especie seleccionada. Sin embargo recientemente se han desarrollado estudios conjuntos de farmacocinética (PK) y farmacodinamia (PD) (enfoque PK/PD) que permiten, no solo conocer los perfiles de concentraciones, sino establecer o seleccionar regímenes terapéuticos adecuados a cada caso y a su vez evitar los problemas antes mencionados, fundamentalmente de resistencia bacteriana. El parámetro PD que se utiliza para definir esta relación es la concentración inhibitoria mínima (MIC), e indica la sensibilidad del microorganismo causante de la infección (en una especie concreta en una región determinada) frente a un antimicrobiano específico. En el enfoque integrado PK/PD se evalúa la eficacia de un antimicrobiano según si su actividad bactericida o bacteriostática depende de las veces que supere la MIC (antimicrobianos concentración dependientes) o del porcentaje de tiempo con relación al intervalo de administración que esté sobre la MIC (antimicrobianos tiempo dependientes), tal como ocurre con los β -lactámicos. El parámetro de eficacia PK/PD empleado para estos últimos es el tiempo en que el antimicrobiano se encuentra sobre la MIC ($T > MIC$).

La simulación Monte Carlo permite que los investigadores puedan simular diferentes regímenes posológicos poblacionales sin el costo capital y animal que eso significa. Los principales elementos para llevar a cabo una simulación de Monte Carlo son: a) un modelo PK robusto y bien definido con los correspondientes parámetros PK (distribución y varianza); b) un modelo de covariables que proporcione información sobre cómo cambian los parámetros PK en función de variables fisio-patológicas o variables demográficas, y c) un modelo PD con una relación definida entre los parámetros PK y PD. Así, la simulación de Monte Carlo nos permite calcular la probabilidad de que con un determinado tratamiento antimicrobiano el valor del índice de eficacia ($T > MIC$) alcance el valor relacionado con la eficacia. Este valor de probabilidad se conoce como probabilidad de alcanzar el objetivo farmacodinámico o *Probability of Target Attainment* (PTA). Valores de $PTA > 90\%$ se consideran indicativos de eficacia (Canut-Blasco *et al.*, 2015).

Por lo expuesto, los objetivos generales de esta tesis fueron: (1) estudiar el comportamiento farmacocinético de cefquinoma tras la administración intravenosa, intramuscular y subcutánea en llamas; (2) aislar cepas regionales de *E. coli* y *S. aureus* y determinar la concentración inhibitoria mínima de cefquinoma; (3) recomendar una pauta posológica racional basada en un análisis farmacocinético/farmacodinámico mediante simulación de Monte Carlo.

Como objetivos particulares se citan los siguientes:

1. Establecimiento y validación de una técnica analítica de detección y cuantificación de cefquinoma por método microbiológico en suero y líquido tisular.
2. Poner a punto la técnica de implantación de cajas tisulares subcutáneas en llamas.
3. Estudiar el comportamiento farmacocinético de la cefquinoma en suero, tras una administración de 2 mg/kg vía intravenosa, intramuscular y subcutánea en llamas adultas.
4. Estudiar el comportamiento farmacocinético de la cefquinoma en líquido tisular, tras una administración de 2 mg/kg vía intravenosa, intramuscular y subcutánea en llamas adultas.
5. Determinar la concentración inhibitoria mínima de cefquinoma frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aislados de infecciones de piel y el tracto digestivo de llamas adultas.
6. Realizar un análisis farmacocinético/farmacodinámico mediante simulación de Monte Carlo para evaluar la eficacia de los regímenes posológicos de cefquinoma en suero y líquido tisular tras una administración de 2 mg/kg vía intravenosa, intramuscular y subcutánea en llamas adultas, frente a los patógenos regionales aislados.

III. MATERIAL Y METODOS

III. MATERIAL Y METODOS

Esta investigación fue aprobada por la Comisión de Bioética y Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba (CBBA.07.2013.UCC). El estudio se realizó en 4 etapas, enumeradas con números romanos del I-IV, las cuales se describen con más detalle a continuación (Tabla 12).

Tabla 12: Descripción de las diferentes etapas del estudio farmacocinético/farmacodinámico de cefquinoma en llamas.

Etapas	Descripción	Animales	Vía	Dosis CFQ
I	Cirugía implantación de cajas tisulares y validación de la técnica analítica	A, B, C, D, E, F	-	-
		A, B	IV	-
	Estudio farmacocinético	C, D	IM	2 mg/kg
		E, F	SC	-
II	Estudio farmacocinético	A, B	IM	-
		C, D	SC	2 mg/kg
		E, F	IV	-
	Estudio farmacocinético	A, B	SC	-
III	Muestreo microbiológico, aislamiento y determinación de la MIC de CFQ en patógenos regionales	C, D	IV	2 mg/kg
		E, F	IM	-
IV	Análisis PK/PD mediante simulación de Monte Carlo de los esquemas posológicos propuestos	-	-	-

III.1. MATERIAL

La descripción del material incluye a los animales, los fármacos, los insumos utilizados durante la implantación de las cajas tisulares, la toma de muestras, su transporte, su procesamiento y el equipamiento empleado en laboratorio.

III.1.1. MATERIAL GENERAL UTILIZADO EN LOS MUESTREOS Y EN LA IMPLANTACIÓN DE CAJAS TISULARES

El material empleado en las diferentes tomas de muestras, transporte y almacenamiento en el laboratorio fueron los siguientes:

- Jeringas y agujas estériles descartables (3 y 5 ml).
- Alcohol 96°.
- Algodón hidrófilo.
- Bisturí.
- Tijeras.
- Pinzas.
- Gasas.
- Sutura no absorbible Tagum[®].
- Planillas de muestreo para suero y para líquido tisular.
- Gradillas.
- Guantes de látex descartables.
- Tubos de centrífuga descartables con tapas, identificados.
- Cajas isotérmicas de poliestireno y geles refrigerantes.
- Reloj digital.
- Puntas para micropipeta de 200 µl y 1000 µl.
- Tubos eppendorf de 2 ml.
- Cajas porta-tubos eppendorf.
- Sogas.
- Xilazina (Xilazina[®] 20% Richmond Vet Pharma, Argentina).
- Lidocaina (Lidocaine[®] 2%, Richmond Vet Laboratory Pharma, Argentina).

III.1.2. CAJAS TISULARES

Las cajas tisulares fueron confeccionadas de policloruro de vinilo (PVC), de forma tubular, con una medida externa de 9,24 cm de largo y 2,20 cm de diámetro interno. Se perforaron con 20 agujeros de 0,89 cm de diámetro, igualmente espaciados con disposición lineal en 5 filas de 4 agujeros cada uno (Figura 8).



Figura 8: Caja tisular de PVC forma tubular. Medidas: 9,24 cm x 2,2 cm.

III.1.3. MATERIALES GENERALES UTILIZADOS EN EL LABORATORIO

- Agar Mueller-Hilton (Britania o Biokar).
- Caldo Cerebro Corazón (Britania).
- Tubos varios con tapa estériles.
- Puntas para micropipetas estériles.
- Placas de Petri plásticas estériles.
- Agar EMB (Levine) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France).
- Agar CHROMagar™ ECC (CHROMagar, Paris-Francia).
- Agar Mannitol-Sal Agar (MSA) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France).
- Agar CHROMagar Staph aureus™ (Biokar Diagnostics, Beauvais, France).
- Kit comercial estéril Eurotubo® con medio de transporte Stuart.

III.1.4. EQUIPAMIENTO UTILIZADO EN EL LABORATORIO

- Bioscreen C (Helsinki, Finlandia).
- Agitador vortex (CKTech VI - 2, Argentina).
- Balanza analítica; sensibilidad 0,1mg (Ohaus Adventurer AR2140, USA).
- Balanza portátil; sensibilidad 0,1g (Ohaus CS 200, USA).
- Balanza para los animales (20g - 200 kg) (BalanCor, Argentina).
- Baño termostático (Mod. Masson. Vicking, Argentina).
- Centrífuga (Rolco 2036, Argentina).
- Micropipetas automáticas volumen variable de 10 µl a 100 µl y de 100 µl a 1000 µl (Socorex, Argentina).
- Purificador de agua (Millipore, USA).
- Peachímetro con electrodo pH/ATC (Denver Instrument UB-10, USA).
- Neveras y congeladores.
- Autoclave VZ100 tipo Chamberland (Argentina).
- Densitómetro (Densimat, BioMérieux; Francia).
- Estufa de cultivo (Faeta; Argentina).
- Cabina de seguridad Biológica Clase II BBC86 (Biotraza, China).
- Micropipetas de 100 y 1000 µl de volumen variable (Socorex, Argentina).
- Autoclave VZ100 tipo Chamberland (Argentina).
- Aparato Multi-inoculador bacteriano de Steers-Foltz.
- Densitómetro (Densimat, BioMérieux; Francia).
- Estufa de cultivo (Faeta; Argentina).

III.2. MÉTODOS

III.2.1. ETAPA I

III.2.1.1. Implantación de cajas tisulares

Se implantaron dos cajas tisulares por animal, en el tejido subcutáneo en el área de los músculos pectorales superficiales, de acuerdo con la técnica descrita por Bengtsson *et al.* (1984). La técnica quirúrgica se realizó bajo sedación profunda con xilazina (Xilazina® 20% Richmond Vet Pharma, Argentina), a una dosis de 0,01 mg/kg IV y anestesia local mediante infiltración con 5 ml lidocaína (Lidocaine® 2%, Richmond Vet Laboratory Pharma, Argentina). La antisepsia del campo quirúrgico se llevó a cabo con alcohol 96%, iodopovidona 10% y clorhexidina 5%. Se realizó una incisión cutánea de 15 cm de largo, se disecó el tejido subcutáneo y se insertó la caja tisular, la cual se fijó con sutura no absorbible y posteriormente se suturó la piel. Las cajas tisulares permanecieron implantadas durante un período de 5 semanas antes del estudio farmacocinético. Durante este periodo de tiempo se realizó un seguimiento cercano de las llamas, a fin de constatar que no se produjeran lesiones, infecciones u otro tipo de alteraciones que pudieran modificar la correcta evolución del proceso de cicatrización. Una vez completado el estudio, las cajas tisulares se retiraron quirúrgicamente utilizando el mismo protocolo anestésico y quirúrgico, sin complicaciones.

III.2.1.2. Metodología analítica

III.2.1.2.1. Detección y cuantificación de cefquinoma

El análisis de las muestras de suero y líquido tisular se llevó a cabo en el laboratorio de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba.

Las concentraciones de CFQ en suero y líquido tisular se determinaron mediante un ensayo microbiológico modificado descrito por Bennett *et al.* (1966) utilizando *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 como microorganismo detector. Para la realización del método se prepararon erlenmeyers con 250 ml de agar Mueller-Hinton (MH) a los cuales se le añadieron 5 ml de un inóculo de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 con $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, correspondiente con una turbidez de 0,5 en la escala de MacFarland, para lo cual se empleó un densitómetro (Densimat®). El agar MH con el inóculo se homogeneizó y se dispensaron 15 ml en placas de Petri de 10 cm de diámetro. Posteriormente se realizaron 5 pocillos de 5 mm de diámetro con un sacabocados estéril. En cada hoyuelo se colocaron 40 µl de solución estándar, suero o líquido tisular. Las muestras de suero y líquido tisular se sembraron por triplicado, mientras que las soluciones estándar se hicieron por quintuplicado. Tras un período de incubación de 18 h a 38°C, se realizaron las mediciones de los halos de inhibición utilizando un calibre digital.

III.2.1.2.2. Preparación de soluciones estándar

Con el fin de confeccionar las soluciones estándar para el análisis por el método microbiológico y las diluciones para la determinación de la MIC, se empleó sulfato de CFQ como fármaco puro, provisto por Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), teniendo en cuenta que la pureza era 99,4% (p/p), según analítica de referencia del proveedor. Se pesó en una balanza analítica (Ohaus Adventurer AR2140; sensibilidad: 0,0001 g) por única vez 10,06 mg de sulfato de CFQ, que contenía 10 mg (10000 µg) de CFQ, la cual se disolvió posteriormente en 10 ml de agua ultrapura para obtener una concentración final de 1000 µg/ml (solución stock), almacenándose a -20°C hasta su utilización.

A partir de la solución inicial de CFQ anteriormente descrita se elaboraron las soluciones madre, las cuales fueron utilizadas para la elaboración de las soluciones stock, que posteriormente se utilizaron para la elaboración de las soluciones estándar. En las Tablas 13, 14 y 15 se muestra el proceso de elaboración de los estándares de CFQ en suero, partiendo de las soluciones stock y teniendo en cuenta las concentraciones finales. Finalmente, las soluciones estándar fueron utilizadas para realizar la validación del método analítico.

Tabla 13: Elaboración y concentraciones finales de las soluciones madres.

Identificación de la Sol. Madre	Vol. SM (ml)	SM usado	Vol. agua (ml)	Vol. final (ml)	SM Conc. (µg/ml)
SM1	-	-	-	10	1000
SM2	3	SM1	3	6	500
SM3	3	SM2	3	6	250
SM4	3	SM3	3	6	125
SM5	3	SM4	3	6	62,50
SM6	3	SM5	3	6	31,25
SM7	3	SM6	3	6	15,63
SM8	3	SM7	3	6	7,81
SM9	3	SM8	3	6	3,91
SM10	3	SM9	3	6	1,95
SM11	3	SM10	3	6	0,98
SM12	3	SM11	3	6	0,49
SM13	3	SM12	3	6	0,24

Tabla 14: Elaboración y concentraciones finales de las soluciones stock (SS).

Identificación de la Sol. Stock	Vol. SM (ml)	SM usado	Vol. agua (ml)	Vol. final (ml)	SS conc. (µg/ml)
SS 1	2	SM1	8	10	200
SS 2	1	SM1	5,667	6,667	150
SS 3	2	SM2	8	10	100
SS 4	2	SM3	8	10	50
SS 5	2	SM4	8	10	25
SS 6	2	SM5	8	10	12,50
SS 7	2	SM6	8	10	6,25
SS 8	2	SM7	8	10	3,13
SS 9	2	SM8	8	10	1,56
SS 10	2	SM9	8	10	0,78
SS 11	2	SM10	8	10	0,39
SS 12	2	SM11	8	10	0,20
SS 13	2	SM12	8	10	0,10
SS 14	2	SM13	8	10	0,05

Tabla 15: Elaboración y concentraciones finales de las soluciones estándar (sol. Std.), utilizados para la validación.

Identificación de la Sol. Std	Vol. SS (ml)	SS usado	Vol. suero (ml)	Vol. final (ml)	Patrón Conc. (µg/ml)
1	1	SS 1	3	4	50
2	1	SS 3	3	4	25
3	1	SS 4	3	5	10
4	1	SS 5	3	5	5
5	1	SS 7	3	6.25	1
6	1	SS 9	3	3.12	0,501
7	1	SS 10	3	3.12	0,250
8	1	SS 11	3	3.12	0,125
9	1	SS 12	3	4	0,049
10	1	SS 13	3	4	0,024
11	1	SS 14	3	4	0,012

III.2.1.2.3. Validación del método microbiológico

Para la validación del método se utilizaron los criterios de linealidad, precisión (variación inter-día e intra-día), exactitud, límite de detección y límite de cuantificación, según lo establece la normativa vigente (VICH / GL2, 1998b).

III.2.1.2.3.1. Linealidad

A partir de los diámetros de los halos de inhibición y la concentración conocida de las soluciones estándar se obtuvo una curva logarítmica mediante regresión no lineal. La ecuación logarítmica resultante fue posteriormente utilizada para el cálculo de la exactitud, variación intra-día e inter-día y la concentración de las muestras de suero y líquido tisular.

III.2.1.2.3.2. Precisión y exactitud

Para el cálculo de precisión, exactitud y límite de cuantificación, se seleccionaron tres concentraciones: 0,125, 1 y 50 µg/ml. Cada solución estándar se sembró por triplicado, tres veces por día (mañana, tarde y noche), durante 3 días consecutivos, por lo que se obtuvieron 18 determinaciones de cada una. La precisión se define como la variación existente entre los resultados obtenidos por el método analítico. La misma refleja la variabilidad propia del método al analizar la muestra (VICH / GL2, 1998b).

$$\text{Precisión \%} = \frac{DE}{100} \times 100$$

Donde DE es la desviación estándar de las soluciones estándar analizadas.

Para la determinación de la variación intra-día, se realizó el cálculo del CV de cada concentración utilizando las determinaciones por sextuplicado en tres momentos del día (mañana, tarde y noche). Para la determinación de la variación intra-día, se determinó el CV de cada concentración por sextuplicado durante tres días consecutivos. Para considerar el método preciso, la variación intra-día e inter-día no deberían ser superiores al 15% (VICH / GL2, 1998).

La exactitud refleja la diferencia que existe entre el promedio de los resultados obtenidos posteriormente a la lectura de un patrón o estándar y el verdadero valor de la concentración (VICH/GL2, 1998). De esta forma, la exactitud es un indicador de la capacidad del método analítico en detectar realmente la concentración de fármaco presente en una muestra. Para su cálculo se aplicó la siguiente ecuación.

$$\frac{\text{Concentración experimental}}{\text{Concentración teórica}} \times 100$$

Para el cálculo de la concentración experimental es necesario utilizar la ecuación obtenida de la curva de calibración con el fin de convertir los diámetros de halo para cada concentración patrón, en concentraciones séricas o de LT. Se utilizó el promedio de tres soluciones estándar por sextuplicado (0,125, 1 y 50 µg/ml). Para poder considerar exacto el método de cuantificación, la variación entre la concentración calculada y la teórica no debe superar el 20% (la concentración calculada debe situarse entre el 80-120% de la teórica (VICH/GL2, 1998).

III.2.1.2.3.3. Límite de detección y cuantificación

Las dos expresiones se relacionan con la sensibilidad del método analítico. El límite de cuantificación se define como la mínima concentración que cumple con los criterios de precisión y exactitud. Se considera este límite teniendo como premisa que debe ser reproducible con una precisión menor o igual del 20 % y una exactitud entre el 80 y 120 %. Se estableció el límite de detección como la mínima concentración que la técnica es capaz de detectar sin repetir los resultados (VICH/GL2, 1998).

III.2.2. ETAPA II

III.2.2.1. Farmacocinética de cefquinoma en suero y líquido tisular vía intravenosa, intramuscular y subcutánea en llamas

III.2.2.1.1. Fármacos

Se utilizaron dos presentaciones comerciales de CFQ (como sal sulfato de cefquinoma base) del laboratorio Intervet (Intervet International, Heideblick-Beesdau, Brandenburg, Alemania):

- Cobactan[®] 4.5%. Solución inyectable para administración IV. Frasco con 4,5 g de CFQ base para reconstituir con 100 ml de solvente. Lote N° A117A02.
- Cobactan[®] 2.5%. Suspensión inyectable para administración extravascular. Frasco de 100 ml con 25 mg de CFQ base. Lote N° A514A01.

III.2.2.1.2. Animales

Se incluyeron en el estudio 6 llamas adultas (*Lama glama*), machos castrados, clínicamente sanos, de raza Chaku, sin antecedentes de enfermedad previa y sin tratamiento farmacológico de ningún tipo durante el mes previo al ensayo (Tabla 16). Los mismos eran propiedad de la Universidad Católica de Córdoba (UCC) de Argentina y se encontraban alojados en el Campus Experimental. Los animales se alimentaron a base de pienso de alfalfa en forma de fardo y agua *ad libitum*. El día previo a los ensayos, los animales fueron alojados en boxes individuales dentro del Hospital Veterinario de la UCC. Se realizó la tricotomía en ambas zonas yugulares y en la zona pectoral, desde el final del canal yugular, las articulaciones del hombro y el inicio del esternón.

Tabla 16: Identificación, peso y edad de los animales incluidos en el estudio farmacocinético.

ID del Animal	Identificación	Edad (años)	Peso (kg)
25	A	2	138
32	B	2,5	87
26	C	2	106
21	D	2	115
33	E	2,5	97
24	F	2,5	135

El estudio farmacocinético se llevó a cabo en tres fases, utilizando un diseño cruzado 3x2. Es decir, en la primera experiencia, 2 animales recibieron CFQ (2 mg/kg) vía IV, otros dos vía IM y los restantes vía SC. En las sucesivas experiencias las vías de administración se fueron rotando, de modo que al final del estudio todos los animales recibieron las tres vías de administración. El periodo de lavado entre ensayos fue de 15 días. En todos los casos se realizaron análisis clínicos para establecer la salud de los mismos.

Previo al inicio del estudio se pesaron los animales con el fin de calcular la dosis total de CFQ. Previo a la administración del antimicrobiano se extrajo una muestra de sangre de la vena yugular y de líquido tisular (muestra a tiempo cero), con el objetivo de constatar la ausencia de inhibidores del crecimiento bacteriano en las muestras. Inmediatamente después, se reconstituyó el preparado comercial de Cobactan® para la vía IV y se verificó que estuviese correctamente disuelto.

Luego de la administración de la CFQ se extrajeron muestras de sangre de la vena yugular a los 2, 6, 12, 20, 30, 45, 60, 90 minutos para la vía IV, y a los 5, 10, 20, 30, 45, 60 minutos para las vías IM y SC, continuando luego a las 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h para todas las vías. En el caso de la administración IV, se utilizó la vena contralateral a la cual se había realizado la administración del preparado.

Las muestras de líquido tisular fueron extraídas mediante punción con aguja hipodérmica en las zonas de los orificios de las cajas tisulares. Se realizó la antisepsia de la piel y se extrajeron 0,5 ml de cada una de las cajas, conformando un total de 1 ml por muestra. Las muestras de líquido tisular se extrajeron a las 0,5, 1, 3, 6, 9, 12 y 24 h por todas las vías.

En la Figura 9 se muestra el esquema para la toma de muestras de suero y líquido tisular, para la vía IV y en la Figura 10 para las vías IM y SC.

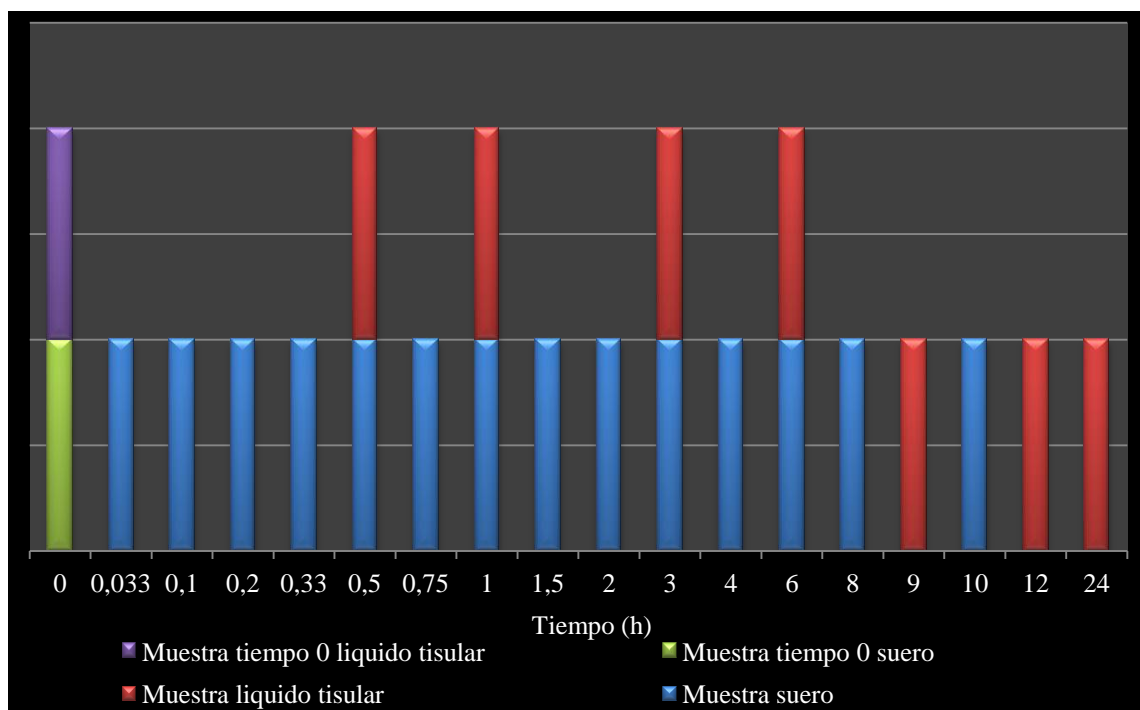


Figura 9: Esquema de toma de muestras de cefquinoma en suero y líquido tisular tras la administración vía intravenosa.

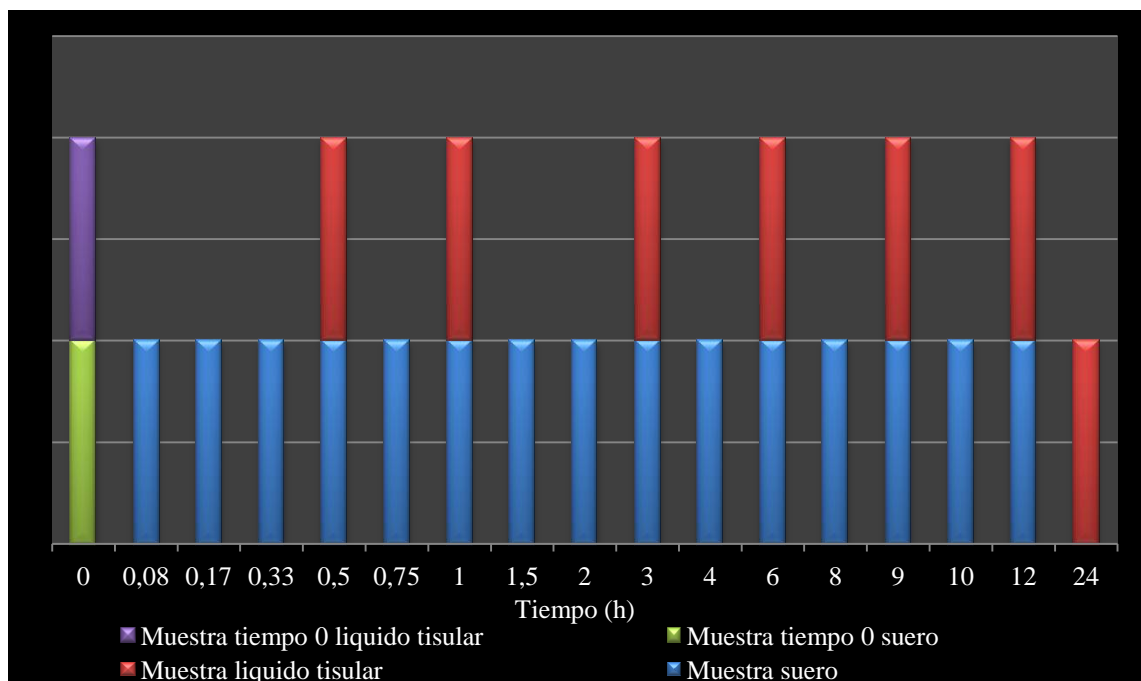


Figura 10: Esquema de toma de muestras de cefquinoma en suero y líquido tisular tras la administración vía intramuscular y subcutánea.

Las muestras de sangre se colocaron en tubos de plástico desechables con tapa para centrifuga identificados con un código alfanumérico. Los mismos fueron almacenados en cajas isotérmicas en gradillas con geles refrigerantes hasta el momento de la extracción del suero en el laboratorio. Los tubos se colocaron en un baño térmico a 38°C durante 45 minutos, para favorecer la retracción del coágulo, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos y el suero sobrenadante se colocó en tubos eppendorf de 2 ml, rotulados de la misma manera que los tubos anteriores. Los tubos eppendorf correspondientes a cada muestra se almacenaron en cajas porta-tubos eppendorf rotuladas y se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis. El tiempo entre el ensayo y el análisis no superó los 2 meses. Por otra parte, el líquido tisular se centrifugó para separar los componentes celulares y, posteriormente, fue almacenado de la misma manera que se realizó con las muestras de sangre.

Cabe destacar que, teniendo en cuenta la posible reacción anafiláctica típica de los β -lactámicos, en cada una de las administraciones de CFQ se controló exhaustivamente a cada uno de los animales en busca de signos de toxicidad, como eritema, edema, taquicardia o cualquier otra manifestación. Esto no ocurrió en ningún momento durante los ensayos.

III.2.2.2. Análisis farmacocinético

Para el análisis farmacocinético de los perfiles de concentración vs tiempo de CFQ en suero y en líquido tisular vía IV, IM y SC, se utilizó el programa informático Winonlin® (Phoenix™ Pharsight Version 6.0). Se seleccionó un modelo no compartimental para el análisis de los datos correspondientes a las vías IV, IM y SC. Además, para el análisis de CFQ en suero vía IV, se aplicó un modelo compartimental (bicompartimental con y sin doble ponderación $1/y^2 * y^2$), seleccionando el modelo que mejor se ajustaba a los criterios de Akaike, al índice de correlación y al índice de Schwarz, después de realizar un análisis con diferentes modelos, ya sea mono, bi o pluricompartimental con diferentes ponderaciones.

La estimación de los parámetros farmacocinéticos se llevó a cabo utilizando el modelo de cálculo basado en la estimación del área bajo la curva (AUC), descrito por el perfil concentración vs tiempo. En este caso, la estimación del AUC se realizó mediante la aplicación del modelo trapezoidal clásico. La segunda técnica mas ampliamente utilizada se basó en el método de los residuos (también llamado “curve stripping” o “feathering”) que resuelve una curva en una serie de términos exponenciales correspondientes a las fases de absorción, distribución y eliminación del fármaco, que se observan en el transcurso del tiempo. Estos términos exponenciales fueron utilizados para calcular los diversos parámetros farmacocinéticos. Las formulas para el cálculo de los parámetros y constantes utilizados para el análisis farmacocinético en suero y líquido tisular se pueden observar en la Tabla 17.

Tabla 17: Parametros y constantes utilizados en el análisis farmacocinetico.

Parametro	No compartimental	Bicompartimental	Formulas
Concentración máxima observada	C_{\max}	-	-
Tiempo correspondiente a la C_{\max}	T_{\max}	-	-
Constante de absorción	λ_a	-	2,303.s s: pendiente de la recta en la fase de absorción
Constantes de distribucion	-	K_{12}	$k_{12} = \frac{(A_1\lambda_2 + A_2\lambda_1)}{(A_1 + A_2)}$
	-	K_{21}	$k_{21} = \lambda_1 + \lambda_2 - k_{12} - k_{10}$
Constante de eliminación	-	λ_e	-2,303.s s: pendiente de la recta en la fase de eliminación
	-	K_{el}	$k_{el} = \lambda_1\lambda_2 / k_{21}$
Semivida de absorción	$t_{1/2}\lambda_a$	=	$\frac{0,693}{\lambda_a}$
Semivida de distribucion	-	$t_{1/2\gamma_1}$	$t_{1/2\gamma_1} = 0.693/\gamma_1$
Semivida de eliminacion	-	$t_{1/2\gamma_2}$	$t_{1/2\gamma_2} = 0.693/\gamma_2$
Área bajo la curva calculada al tiempo final observado	AUC_{0-t}	-	$\sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} (C_i + C_{i+1})$ T: tiempo; C: concentración
Área bajo la curva extrapolada a infinito	AUC_{∞}	-	$AUC_{0-t} + \frac{C_n}{\lambda_e}$ C _n : concentración final observada
			$AUC = \left(\frac{A_1}{\gamma_1}\right) + \left(\frac{A_2}{\gamma_2}\right)$
Biodisponibilidad	F	-	$\frac{AUC_{\text{via IM}} \cdot \text{Dosis}_{\text{via IV}}}{AUC_{\text{via IV}} \cdot \text{Dosis}_{\text{via IM}}}$

AUC del primer momento estadístico (C.t vs t)	AUMC _∞	-	$\left[\sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} (C_i \cdot t_i + C_{i+1} \cdot t_{i+1}) + \frac{C_n \cdot t_n}{\lambda_e} + \frac{C_n}{\lambda_e^2} \right]$ $t_n = \text{tiempo final observado}$
Tiempo medio de residencia	MRT	-	$\frac{AUMC_{\infty}}{AUC_{\infty}}$
Tiempo medio de absorción	MAT	-	$MRT_{\text{vía IM-SC}} - MRT_{\text{vía IV}}$
Volumen aparente de distribución calculado por el método del área	Vd _{area}		$\frac{\text{Dosis}}{AUC_{\infty} \cdot \lambda_e}$ $\frac{\text{Dosis}}{AUC \cdot \gamma^2}$
Volumen aparente de distribución en el estado estacionario	Vd _{ss}		$\frac{\text{Dosis} \cdot AUMC_{\infty}}{AUC_{\infty}^2}$ $Vd_{ss} = \frac{V_1(k_{12} + k_{21})}{k_{21}}$
Aclaramiento total	Cl		$\frac{\text{Dosis} \cdot F}{AUC_{\infty}}$ $Cl = k_{10} V_1$

III.2.3. ETAPA III: MUESTREO MICROBIOLÓGICO Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE CEFQUINOMA EN CEPAS REGIONALES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *ESCHERICHIA COLI* EN LLAMAS ENFERMAS

III.2.3.1. Muestreo microbiológico

Cuando se comenzó con el planteamiento del presente trabajo, se realizó un instructivo para mantener una vigilancia sobre un plantel de animales y poder determinar cualquier patología de origen bacteriano, con el fin de tomar las muestras microbiológicas correspondientes. La frecuencia de aparición de patologías infecciosas cutáneas o de tejidos blandos y/o digestivas fue baja. Hubo registros de alta incidencia específicamente de cuadros cutáneos, debido a lesiones traumáticas que recibieron las llamas (por heridas propias de los arbustos e instalaciones y peleas). Se tomaron 38 muestras microbiológicas de piel y 30 de materia fecal. Para la toma de muestras de piel, se procedió a una desinfección en el área circundante de la zona a analizar con alcohol al 70%, con la finalidad de no contaminar la zona de toma de muestras, que es la propia lesión, mientras que para la toma de muestras de materia fecal, se desinfectó la zona perianal para poder obtener una muestra del recto, realizando un hisopado. El operario se colocó guantes estériles y se utilizó un kit comercial estéril Eurotubo® con medio de transporte Stuart. Inmediatamente después de la toma de muestra, el tubo fue transportado al laboratorio de Farmacología y Toxicología de la UCC.

Dada la amplia contaminación bacteriana que presentaron las muestras se decidió dirigir la búsqueda hacia microorganismos que plantean mayor grado de dificultad para la terapéutica antimicrobiana. El microorganismo más representativo en piel es *Staphylococcus aureus*. Las muestras de infección de heridas se cultivaron en primer lugar en medio Mannitol-Sal Agar (MSA) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) a 38° C durante 24 h, se seleccionaron colonias características (de color amarillo, en este medio de cultivo) se cultivaron en CHROMagar Staph aureus™ (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) dando como resultado colonias rosa malva. Teniendo en cuenta un criterio similar en las muestras fecales se direccionó la selección de un patógeno que fuese un indicador de resistencia y a su vez causante de procesos gastrointestinales como *Escherichia coli*. Se cultivaron en agar EMB (Levine) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) y posteriormente las colonias típicas (colonias negro azulado con verde-metalico en ese medio de cultivo) se incubaron a 38°C durante 24 h en CHROMagar™ ECC (CHROMagar, Paris-Francia) resultando en colonias azules. A partir de las muestras microbiológicas de piel y materia fecal se aislaron cepas regionales de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*. Las mismas se almacenaron en tubos eppendorff con caldo cerebro corazón y glicerol en una proporción 70%/30% v/v a -80 °C hasta su posterior análisis.

III.2.3.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de cefquinoma en cepas regionales de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en llamas enfermas

A partir de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aisladas, se determinó la MIC por el método de microdilución en caldo, según las recomendaciones del CLSI (2013). Se emplearon como control cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922. Se utilizaron 11 diluciones en el intervalo de concentraciones de 0,033 a 16 µg/ml. Para su elaboración, se disolvieron 32 mg de CFQ (corregidos por pureza) del estándar de CFQ sulfato en 10 ml de agua destilada. La elaboración de los estándares para la determinación de la MIC se realizó de manera similar a las soluciones estándar para la validación del método de cuantificación descrito anteriormente. En las Tablas 18 y 19 se muestra el proceso de elaboración de estándares.

Tabla 18: Elaboración de Soluciones madre para la elaboración de estándares de cefquinoma para la determinación de la concentración inhibitoria mínima.

Identificación de la Sol. Madre (SM)	Vol. SS (ml)	Vol. SM (ml)	Vol. agua agregado (ml)	Patrón Conc. SM (µg/ml)
Solución stock (SS)	-	-	-	3200
1	1	-	9	320
2	-	2	2	160
3	-	2	2	80
4	-	2	2	40
5	-	2	2	20
6	-	2	2	10
7	-	2	2	5
8	-	2	2	2,5
9	-	2	2	1,25
10	-	2	2	0,62

Tabla 19: Elaboración de soluciones estándares de cefquinoma, utilizando las Soluciones madre para la determinación de concentración inhibitoria mínima.

Identificación de la Sol. Madre (SM)	Vol. SM (ml)	Sol. Madre utilizada	Vol. Caldo MH agregado (ml)	Patrón Conc. Sol. Estándar (µg/ml)
1	0.5	SM 3	4.5	8
2	0.5	SM 4	4.5	4
3	0.5	SM 5	4.5	2
4	0.5	SM 6	4.5	1
5	0.5	SM 7	4.5	0,5
6	0.5	SM 8	4.5	0,25
7	0.5	SM 9	4.5	0,125
8	0.5	SM 10	4.5	0,062
9	0.25	SM 10	4.5	0,033
10	0.25	SM 10	9	0,015

Las soluciones estándar de CFQ fueron vertidas asépticamente en las placas. Las mismas están confeccionadas de poliestireno transparente de 122 mm de largo por 80 mm de ancho. Constaban de 96 pocillos (12 columnas y 8 filas), donde se sembraron las muestras (Figura 11).

Se utilizaron 0,05 ml de solución estándar y 0,05 ml de caldo MH estéril. Esto dio como resultado que la concentración final de los estándares de CFQ estuviera en el rango de 8 a 0,015 µg/ml.

En cuanto a los inóculos, las cepas de *S. aureus* y las cepas de *E. coli* (tanto las aisladas de llamas como la cepa control ATCC), fueron cultivadas a 38°C durante 24 horas en medio MSA (Chapman) y en medio EMB, respectivamente. A partir del cultivo fresco se elaboraron los inóculos para la determinación de la MIC. Para ello se prepararon inóculos madre con una densidad de 10^8 UFC/ml en solución salina 0.9%, correspondiente a 0,5 en la escala de McFarland. Una vez obtenida esa dilución, se procedió a realizar dos diluciones más, con el fin de obtener el inóculo final con 10^6 UFC/ml. En cada orificio se colocó cada una de las cepas y se las enfrentó a todas las concentraciones de los estándares. En las ultimas dos columnas se colocaron los controles positivos (cepa sin CFQ) y el control negativo (solamente la solución estándar) (Figura 11).

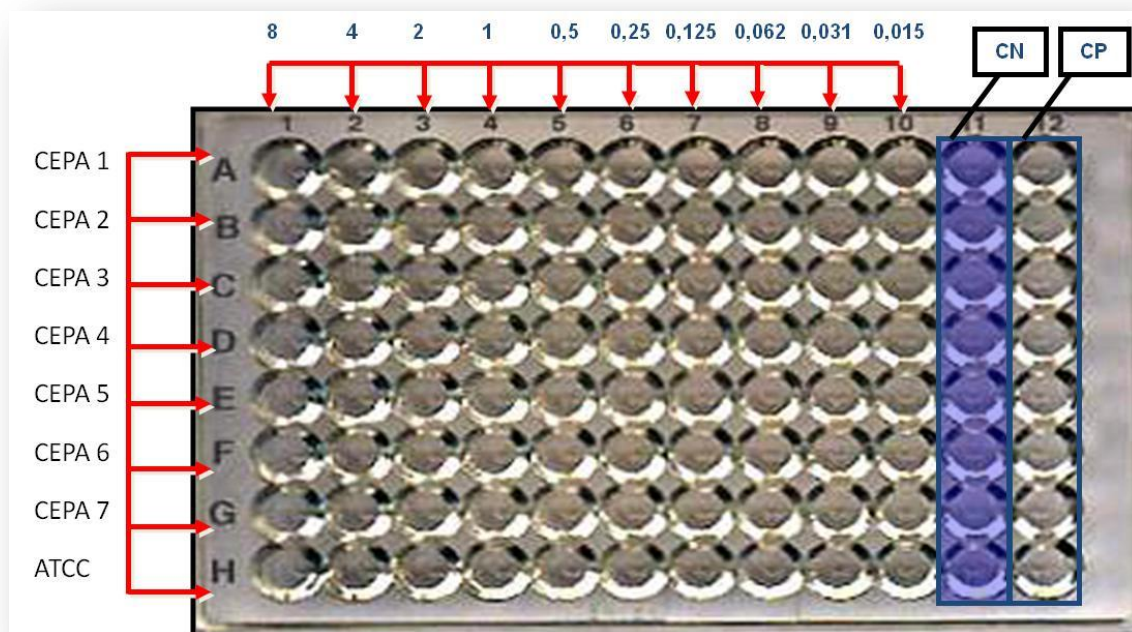


Figura 11 : Patrón de siembra de las cepas y soluciones estándar de cefquinoma dentro de la placa de microdilución en caldo.

Además se sembraron cepas control (ATCC) sin CFQ para evaluar la ausencia de contaminación o de traspaso de ATM durante el procedimiento. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 a 24 h. Transcurrido dicho tiempo, las placas se observaron sobre una superficie oscura. Se registró la MIC como la concentración más baja de CFQ que inhibió completamente el crecimiento bacteriano.

A partir de los resultados individuales de cada cepa, se procedió a calcular la MIC₅₀ y MIC₉₀ mediante el método de frecuencia acumulada correspondiente al percentil 50 y 90. La relación MIC₉₀/MIC₅₀ también se calculó para las cepas de *S. aureus* y *E. coli*.

III.2.4. ETAPA FARMACOCINÉTICO/FARMACODINÁMICO SIMULACIÓN DE MONTE CARLO

IV: ANÁLISIS MEDIANTE

Se llevó a cabo un análisis de PK/PD mediante simulación de Monte Carlo con los datos farmacocinéticos de las vías IV, IM y SC y los valores de MIC provenientes de los patógenos regionales aislados en llamas enfermas. Dado que los β -lactámicos se consideran antimicrobianos tiempo-dependiente, se utilizó el indicador PK/PD $T > MIC$. Los valores de $T > MIC$ individuales de cada animal se determinaron mediante observación directa a partir de los perfiles de concentración-tiempo. Para mejorar la precisión del cálculo se aplicó una interpolación por regresión lineal entre los datos de MIC y los perfiles concentración-tiempo. $T > MIC$ se expresó como un porcentaje del intervalo de dosificación en llamas (12h) (Toutain *et al.*, 2002, McKellar *et al.*, 2004, Papich, M.G., 2014). A partir de los datos de $T > MIC$ individuales, se realizó un análisis PK/PD de 10.000 sujetos mediante simulación de Monte Carlo, se calcularon para los regímenes de dosificación de CFQ vía IV, IM y SC en suero y líquido tisular, utilizando el software Oracle Crystal Ball V.11.1.1.0.00 (Oracle Corporation, Redwood Shores, CA, EUA). Se asumió que los datos de $T > MIC$ presentaron una distribución log-normal. Dicha distribución se observa en la mayoría de variables de tipo biológico, y se caracteriza por presentar una asimetría desviada hacia la derecha, debido a que la variable no puede ser igual a 0 o presentar valores negativos. Los puntos de corte PK/PD utilizados en este análisis fueron $T > MIC$ de 50 y 80% del intervalo de dosis (Toutain *et al.*, 2002; McKellar *et al.*, 2004; Papich, M.G., 2014). Se determinó la probabilidad de alcanzar el objetivo (PTA), definida como la probabilidad de que el régimen de dosis alcance el punto de corte PK/PD determinado para cada valor de MIC y la fracción de respuesta acumulada (CFR), definida como la probabilidad de que el régimen de dosificación alcance un determinado punto de corte del parámetro PK/PD analizado, teniendo en cuenta la distribución de la MIC de la población bacteriana estudiada. La CFR se calculó mediante la fórmula (Asín-Prieto *et al.*, 2015):

$$CFR = \sum_{i=1}^n PTA(MIC_i) \times p(MIC_i)$$

En esta fórmula, el valor de la PTA, para cada nivel de MIC, se multiplica por la frecuencia relativa de la MIC en la población bacteriana estudiada. Se utilizó un punto de corte de PTA y $CFR \geq 90\%$ para considerar una adecuada eficacia antimicrobiana del régimen posológico propuesto, según lo establece la bibliografía (Asín-Prieto *et al.*, 2015; Canut-Blasco *et al.*, 2015).

III.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los parámetros farmacocinéticos de suero y líquido tisular fueron analizados por el programa estadístico Infostat[®], versión 2015-I. Los datos fueron analizados utilizando un análisis de la varianza (ANOVA) por bloques, previa confirmación de cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante pruebas de Shapiro Wilks a los residuales y ANOVA a los residuales absolutos. En el caso de que los datos no cumplieran con los supuestos anteriores, se utilizó un test no paramétrico de Friedmann para muestras pareadas. En todos los casos el nivel de significación fue del 5% ($p < 0,05$). Los índices líquido tisular/suero fueron analizados con un test t para muestras pareadas, previa confirmación de cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante pruebas de Shapiro Wilks. Los valores de MIC₅₀ y MIC₉₀ fueron calculados por el método de frecuencia acumulada, al igual que la relación MIC₅₀/MIC₉₀.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. EXAMEN CLÍNICO DE LOS ANIMALES

Previo a la realización de los ensayos farmacocinéticos se realizó un examen físico completo y análisis sanguíneo (que incluyó hematología completa y bioquímica sérica) y análisis coproparasitológico, el cual resultó negativo en todos los animales. Los datos se exponen en la Tabla 20.

Tabla 20: Hematología y bioquímica sanguínea previa al ensayo farmacocinético y valores de referencia.

Parametro	Animal						Referencia*
	25	32	26	21	33	24	
Hematocrito (%)	27	31	30	36	30	31	32-36
Hemoglobina (g/dl)	14	14,33	13,2	15	14	13,33	13-15
Glóbulos rojos ($10^6 \times \text{mm}$)	11,3	12,95	13,15	14,15	14,1	12,95	13-14
Leucocitos ($10^3 \times \text{mm}$)	9,8	7,2	6,7	17,5	17,8	11,9	13-15
Neutrófilos en banda (%)	0	1	0	0	2	3	0-3
Neutrófilos segmentados (%)	38	41	55	39	41	55	59
Basófilos (%)	1	0	0	0	1	1	0-1
Linfocitos (%)	26	32	26	10	22	23	27
Monocitos (%)	1	1	3	2	3	4	3
Urea (mg/dl)	40	54	66	45	60	40	21-26
Creatinina (mg/dl)	2,7	2,7	2,5	2,6	2,9	2,4	1,6-1,8
GOT (UI/ ml)	52	57	69	71	70	87	272-312
GPT (UI/ml)	4	4	7	5	3	4	8
GGT (UI/ ml)	17	12	16	10	13	16	28
FA (UI/ ml)	129	308	229	311	199	215	50-340
CPK (UI/ ml)	25	26	72	77	98	46	0-115

* Valores de referencia según Hawkey y Gulland, 1988; Lassen *et al.*, 1986; Mulrooney *et al.*, 1989; Tornquist, S.J., 2009; Fowler y Zinkl, 1989; Garry, F., 1989; Garry *et al.*, 1994).

Los resultados tanto del examen clínico como de los complementarios pusieron de manifiesto el correcto estado de salud de los animales. Durante el tiempo que duró el estudio no se observaron modificaciones o manifestaciones de ese estado. Tampoco se observó inflamación o manifestaciones de dolor o incomodidad tras la administración de los preparados a estudiar por las diferentes vías

IV.2. ETAPA I

IV.2.1. IMPLANTACIÓN CAJAS TISULARES

Tras la cirugía se produjo una cicatrización adecuada y sin complicaciones, ya que los animales no se mordieron ni sufrieron heridas en esa zona. Al cabo de 10 días se había completado el proceso de cicatrización, sin cuadros de infecciones u otras alteraciones dignas de mención. Se produjo un crecimiento adecuado del tejido de granulación necesario para la obtención del líquido tisular, durante el tiempo transcurrido hasta el comienzo de la etapa III, un mínimo de 5 semanas posteriores a dicha implantación. No se evidenció dolor, ni ningún tipo de molestia en la zona de la implantación. Tampoco se produjeron infecciones, tanto dentro de la caja tisular como en el tejido circundante en el periodo posterior a las 5 semanas de espera.

IV.2.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA: VALIDACION DEL MÉTODO

IV.2.2.1. Linealidad

A partir de soluciones estándar en suero de llama se elaboró una curva de calibración logarítmica mediante regresión no lineal entre la concentración de las soluciones estándar y los diámetros de los halos de inhibición, en el intervalo de concentraciones entre 0,058 y 50 µg/ml (Figura 12).

La relación existente entre las concentraciones del intervalo y los diámetros pertenecientes a los halos de inhibición de crecimiento bacteriano presentaron una tendencia logarítmica. La ecuación de la función logarítmica y el coeficiente de regresión fueron: $y = 2,987 \ln(x) + 17,30$; $r^2 = 0,966$

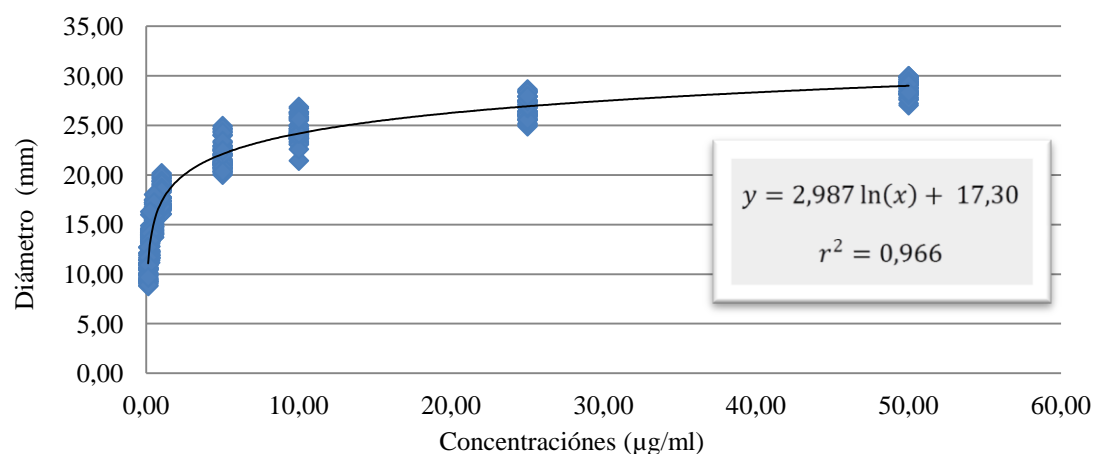


Figura 12: Representación de la curva logarítmica obtenida por regresión no lineal de la relación entre las concentraciones de cefquinoma en suero de llama y el diámetro del halo de inhibición bacteriano.

IV.2.2.2. Precisión y exactitud

En las Tablas 21 y 22 se exponen los valores correspondientes a la variación intra-día e inter-día para suero de llama para las tres concentraciones seleccionadas (0,125, 1, 50 µg/ml). Para el cálculo de la concentración de 0,125 µg/ml fueron utilizadas 18 mediciones, mientras que para las dos restantes fueron tomadas 6 lecturas por concentración. El coeficiente de varacion (CV) fue inferior a 15% en todos los casos.

Tabla 21: Valores correspondientes a la variación intra-día.

0,125 µg/ml			1 µg/ml			50 µg/ml		
Media	DE	CV	Media	DE	CV	Media	DE	CV
11,18	1,00	8,98	18,88	1,18	6,26	29,24	0,48	1,65

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

Tabla 22: Valores correspondientes a la variación inter-día.

0,125 µg/ml			1 µg/ml			50 µg/ml		
Media	DE	CV	Media	DE	CV	Media	DE	CV
10,68	1,06	9,96	18,22	1,26	6,94	29,23	0,59	2,00

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

En la Tabla 23 se exponen los valores de exactitud para las tres concentraciones utilizadas (0,125, 1, 50 µg/ml). Para el cálculo de la concentración 0,125 µg/ml fueron utilizadas 18 mediciones, mientras que para las dos restantes fueron tomadas 6 lecturas por concentración. Los resultados se encontraron entre 80-120%.

Tabla 23: Valores correspondientes a la exactitud

0,125 µg/ml			1 µg/ml			50 µg/ml		
Media	DE	Exactitud (%)	Media	DE	Exactitud (%)	Media	DE	Exactitud (%)
0,126	0,001	100,740	1,023	0,013	102,262	51,133	0,356	102,267

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

IV.2.2.3. Límite de detección y cuantificación

El límite de cuantificación del método analítico calculado para las diferentes concentraciones de CFQ fue de 0,125 µg/ml, el cual es el valor más bajo que presenta exactitud y precisión. El valor de exactitud fue de $112 \pm 2,33$ y la precisión de $5,97 \pm 0,23$. Por otra parte el límite de detección fue de 0,058 µg/ml.

IV.3. ETAPA II: FARMACOCINÉTICA DE CEFQUINOMA EN SUERO Y LÍQUIDO TISULAR EN LLAMAS TRAS LA ADMINISTRACIÓN VÍA INTRAVENOSA, INTRAMUSCULAR Y SUBCUTÁNEA

Los perfiles de concentración vs tiempo en suero mostraron un comportamiento típico de una administración IV y extravascular, respectivamente. En la Figura 13 y 14 se muestran los perfiles de concentración vs tiempo de CFQ vía IV, IM y SC en suero y líquido tisular, respectivamente.

Los parámetros farmacocinéticos de CFQ en suero tras una administración IV, IM y SC luego de realizar un análisis compartimental y no compartimental se muestran en las Tablas 24 y 25.

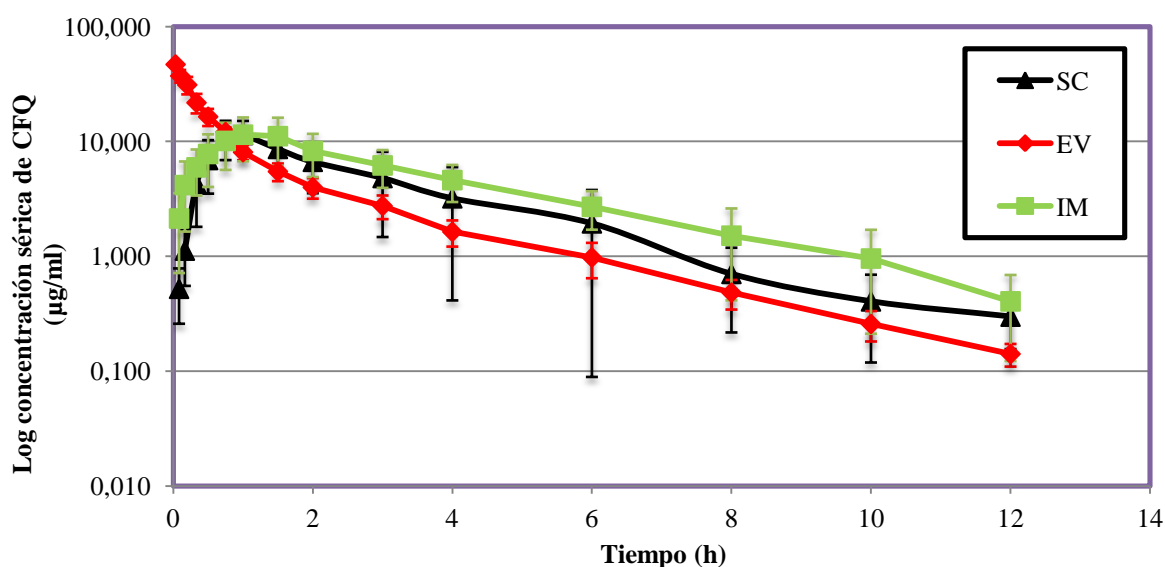


Figura 13: Evolución de las concentraciones séricas de cefquinoma tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa, intramuscular y subcutánea en llamas adultas (n=6). Los datos se expresan como media \pm desvío estándar.

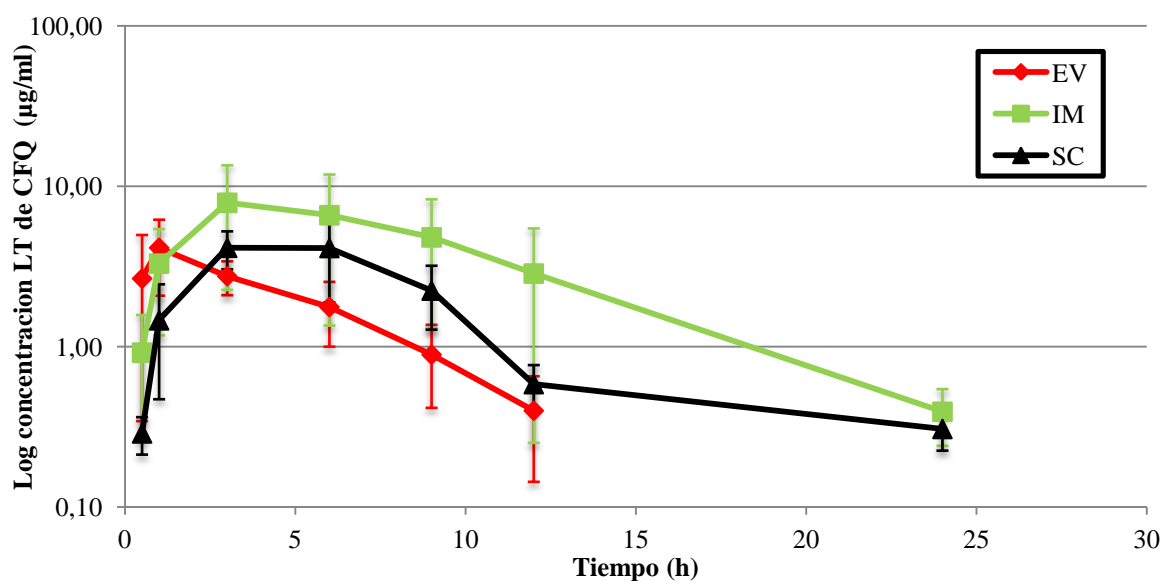


Figura 14: Evolución de las concentraciones en líquido tisular de cefquinoma tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa, intramuscular y subcutánea en llamas adultas (n=6). Los datos se expresan como media \pm desvio estandar.

La concentraciones séricas y de líquido tisular de CFQ, para la vía IV, en los 6 animales se mantuvieron por encima del límite de cuantificación hasta las 12 h postadministración. Para la vía IM, ocurrió lo mismo para las concentraciones séricas, pero en líquido tisular las concentraciones se mantuvieron hasta las 24 h. Lo mismo ocurrió en la vía SC.

Tabla 24: Parámetros farmacocinéticos plasmáticos tras la administración de una dosis de 2 mg/kg de cefquinoma vía intravenosa. Análisis bicompartimental y análisis no compartimental.

Parámetro	Análisis bicompartimental	Análisis no compartimental
α (h)	2,36±0,31	-
β (h)	0,33±0,03	-
A (µg/ml)	39,58±3,95	-
B (µg/ml)	6,47±2,08	-
$t^{1/2}_{\alpha}$ (h)	0,30±0,03	-
$t^{1/2}_{\beta}$ (h)	2,15±0,17	2,31±0,24
$t^{1/2} K_{10}$ (h)	0,55±0,03	-
C ₀ (µg/ml)	46,03±5,90	51,89±3,27
AUC _∞ (µg.h/ml)	36,61±5,80	37,61±6,21
AUC _{0-t} (µg.h/ml)	-	37,14±6,17
AUMC (µg.h/ml)	67,99±15,6	-
MRT _∞ (h)	1,86±0,14	1,87±0,11
MRT _{0-t} (h)	-	1,70±0,01
V _{ss} (L/kg)	0,10±0,01	0,10±0,01
V _z (L/kg)	0,04±0,01	0,18±0,04
Cl (L/kg.h)	0,06±0,01	0,05±0,01
K ₁₀ (h)	1,26±0,06	-
K ₁₂ (h)	0,80±0,18	-
K ₂₁ (h)	0,60±0,10	-

α : constante de distribución; β : constante de eliminación; A: intercepción en la fase de distribución; B: intercepción en la fase de eliminación; $t^{1/2}_{\alpha}$: semivida de distribución; $t^{1/2}_{\beta}$: semivida de eliminación; $t^{1/2} K_{10}$: semivida de absorción; C₀:concentración máxima; AUC_∞: área bajo la curva extrapolada a infinito; AUC_{0-t}: área bajo la curva calculada desde tiempo cero al tiempo final observado; AUMC_∞: área bajo el primer momento estadístico de la curva; MRT_∞: tiempo medio de residencia desde tiempo cero al infinito; MRT_{0-t}: tiempo medio de residencia desde tiempo cero al tiempo final observado; V_{ss}: volumen de distribución en estado estacionario; V_{d,area}: volumen de distribución; Cl: aclaramiento; K₁₀:constante de eliminación del compartimiento central; K₁₂: constante de paso del compartimiento central al periférico; K₂₁: constante de paso del compartimiento periférico al central.

Tabla 25: Parámetros farmacocinéticos (análisis no compartimental) séricos y en líquido tisular entre las vías intravenosa, intramuscular y subcutánea.

Parámetro	IV	IM	SC
<i>Suero</i>			
C_0/C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	51,89 \pm 3,27 ^a	12,80 \pm 4,72 ^b	12,49 \pm 3,28 ^b
T_{\max} (h)	-	1,08 \pm 0,34 ^a	1,04 \pm 0,49 ^a
$t_{1/2\lambda_a}$ (h)	-	1,16 \pm 0,36 ^a	0,80 \pm 0,37 ^a
MAT (h)	-	1,86 \pm 0,75 ^a	2,30 \pm 1,57 ^a
Vd_{area} (L/kg)	0,18 \pm 0,04	-	-
Vd_{ss} (L/kg)	0,10 \pm 0,01	-	-
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	37,14 \pm 6,17 ^a	45,77 \pm 16,61 ^a	34,65 \pm 12,98 ^a
AUC_{∞} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	37,61 \pm 6,21 ^a	47,11 \pm 17,02 ^a	36,93 \pm 12,92 ^a
Cl (L/kg \cdot h)	0,05 \pm 0,01	-	-
$t_{1/2\lambda_e}$ (h)	2,31 \pm 0,24 ^a	2,18 \pm 0,60 ^a	2,97 \pm 0,59 ^a
MRT_{∞} (h)	1,70 \pm 0,01 ^a	3,37 \pm 0,49 ^b	2,85 \pm 0,57 ^b
F (%)	-	124,00 \pm 45,00 ^a	94,00 \pm 35,00 ^b
Párametro	IV	IM	SC
<i>Líquido tisular</i>			
T_{\max} (h)	1,25 \pm 0,88 ^a	4,50 \pm 2,51 ^b	4,00 \pm 1,55 ^b
C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	4,25 \pm 1,98 ^a	8,39 \pm 5,80 ^a	4,82 \pm 1,83 ^a
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	21,98 \pm 5,78 ^a	82,42 \pm 52,04 ^{ab}	37,65 \pm 10,76 ^b
AUC_{∞} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	23,71 \pm 6,77 ^a	85,40 \pm 52,14 ^{ab}	41,05 \pm 10,66 ^b
$t_{1/2\lambda_e}$ (h)	5,75 \pm 4,86 ^a	4,89 \pm 1,39 ^a	8,81 \pm 2,09 ^a
MRT_{∞} (h)	4,08 \pm 0,90 ^a	7,72 \pm 1,14 ^b	7,10 \pm 0,93 ^b
Relación $AUC_{LT}/AUC_{\text{Suero}}$	0,60 \pm 0,17 ^a	1,98 \pm 1,32 ^b	1,13 \pm 0,17 ^b
Relación $t_{1/2\lambda_{eLT}}/ t_{1/2\lambda_{eSuero}}$	2,65 \pm 2,44 ^a	2,27 \pm 0,49 ^a	3,11 \pm 1,11 ^a
Relación $MRT_{LT}/ MRT_{\text{Suero}}$	2,19 \pm 0,51 ^a	2,30 \pm 0,31 ^a	2,62 \pm 0,85 ^a
Relación $C_{\max LT}/ C_{\max \text{Suero}}$	0,83 \pm 0,40 ^a	2,06 \pm 1,19 ^b	0,60 \pm 0,35 ^a

C_0/C_{\max} : concentración máxima; T_{\max} : tiempo correspondiente a la concentración máxima; $t_{1/2\lambda_a}$: semivida de absorción; MAT: tiempo medio de absorción; Vd_{area} : volumen de distribución; Vd_{ss} : volumen de distribución en estado estacionario; AUC_{0-t} : área bajo la curva calculada desde tiempo cero al tiempo final observado; AUC_{∞} : área bajo la curva extrapolada a infinito; Cl: aclaramiento; $t_{1/2\lambda_e}$: semivida de eliminación; MRT_{∞} : tiempo medio de residencia desde tiempo cero al infinito; F: biodisponibilidad.

IV.4. ETAPA III. MUESTREO MICROBIOLÓGICO Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE CEFQUINOMA EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *ESCHERICHIA COLI* EN LLAMAS ENFERMAS

Luego del cultivo y aislamiento de muestras provenientes de llamas enfermas, se aislaron 35 cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de muestras de piel y 28 cepas de *Escherichia coli* provenientes de materia fecal. El valor de MIC de cada cepa se determinó por el método de microdilución en caldo, como lo recomienda el CLSI (2013). Como control, se usaron cepas *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 25922. Las 63 cepas resultaron sensibles en el rango de concentraciones de 0,015 a 8 µg/ml. Los valores de MIC₅₀ y MIC₉₀ fueron de 0,25 y 0,50 y de 0,031 y 0,063 para *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente.

La distribución de frecuencias relativas de las MIC de CFQ para *Staphylococcus aureus* se muestran en la Tabla 26 y Figura 15, mientras que los correspondientes a cepas de *Escherichia coli*, se muestran en la Tabla 27 y Figura 16.

Tabla 26: Distribución de frecuencias relativas de concentración inhibitoria minima de cefquinoma, incluyendo concentración inhibitoria 50 y concentración inhibitoria 90, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* en llamas.

Número de cepas inhibidas con una MIC (µg/ml) de CFQ						µg/ml	
0,015	0,031	0,063	0,125	0,250	0,500	MIC ₅₀	MIC ₉₀
1	2	4	10	15	3	0,250	0,5

Tabla 27: Distribución de frecuencias relativas de concentración inhibitoria minima de cefquinoma, incluyendo concentración inhibitoria 50 y concentración inhibitoria 90, frente a cepas de *Escherichia coli* en llamas.

Número de cepas inhibidas con una MIC (µg/ml) de CFQ						µg/ml	
0,015	0,031	0,063	0,125	-	-	MIC ₅₀	MIC ₉₀
3	10	13	2	-	-	0,031	0,063

La frecuencia de cepas regionales de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en llamas inhibidas por CFQ responde a una distribución normal, la cual se observa en las Figuras 15 y 16.

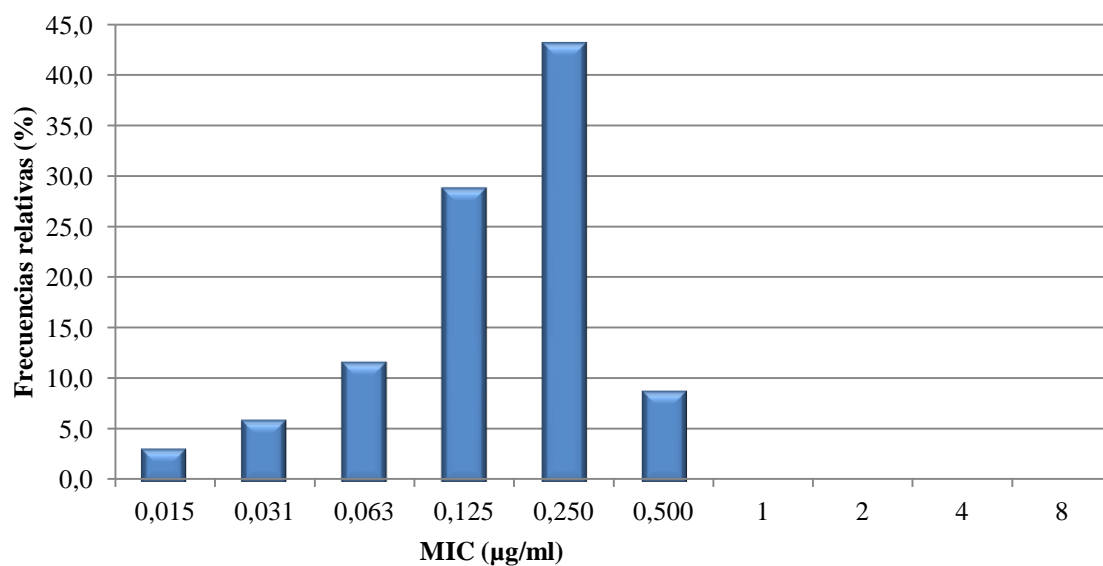


Figura 15: Distribución de las concentraciones mínimas inhibitorias de *S. aureus* aislados en heridas de piel en llamas.

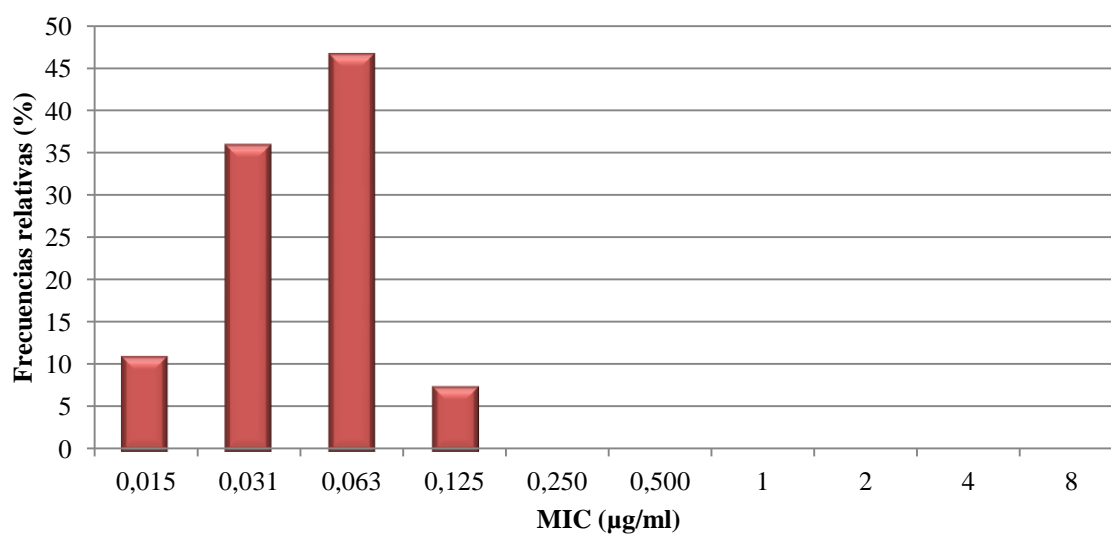


Figura 16: Distribución de las concentraciones mínimas inhibitorias de *E. coli* aislados en heridas de piel en llamas.

IV.5. ETAPA IV: ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO/FARMACODINÁMICO MEDIANTE SIMULACIÓN DE MONTE CARLO

Tras el análisis PK/PD mediante simulación de Monte Carlo de los valores de T>MIC en suero y líquido tisular obtenidos tras la administración de 2 mg/kg de CFQ vía IV, IM y SC, y las MIC de patógenos regionales aislados de las llamas, se determinaron las PTA y CFR que se presentan en las Tablas 28 y 29 y también en las Figuras 17 y 18.

Tabla 28: Valores de probability of target attainment y cumulative fraction of response para un T>MIC $\geq 50\%$ en suero y líquido tisular tras la administración de cefquinoma por vía intravenosa, intramuscular y subcutánea, frente a cepas regionales de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en llamas.

Vía		PTA	PTA	PTA	PTA	PTA	PTA	CFR <i>E. coli</i>	CFR <i>S. aureus</i>
		0,015	0,031	0,063	0,125	0,250	0,500		
IV	Suero	100	100	100	100	100	99,83	100	99,98
	LT	100	100	100	100	100	100	100	100
IM	Suero	100	100	100	100	100	99,95	100	99,99
	LT	100	100	100	100	100	100	100	100
SC	Suero	100	100	100	100	100	86,29	100	98,92
	LT	100	100	100	100	100	100	100	100

Los resultados de PTA y CFR se expresan como %

Tabla 29: Valores de probability of target attainment y cumulative fraction of response para un T>MIC $\geq 80\%$ en suero y líquido tisular tras la administración de cefquinoma por vía intravenosa, intramuscular y subcutánea, frente a cepas regionales de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en llamas.

Vía		PTA	PTA	PTA	PTA	PTA	PTA	CFR	CFR
		0,015	0,031	0,063	0,125	0,250	0,500	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
IV	Suero	100	100	100	100	79,27	0,23	100	82,64
	LT	100	100	100	100	100	100	100	100
IM	Suero	100	100	100	100	100	73,97	100	97,78
	LT	100	100	100	100	100	100	100	100
SC	Suero	100	100	100	100	100	26,08	100	93,71
	LT	100	100	100	100	100	100	100	100

Los resultados de PTA y CFR se expresan como %.

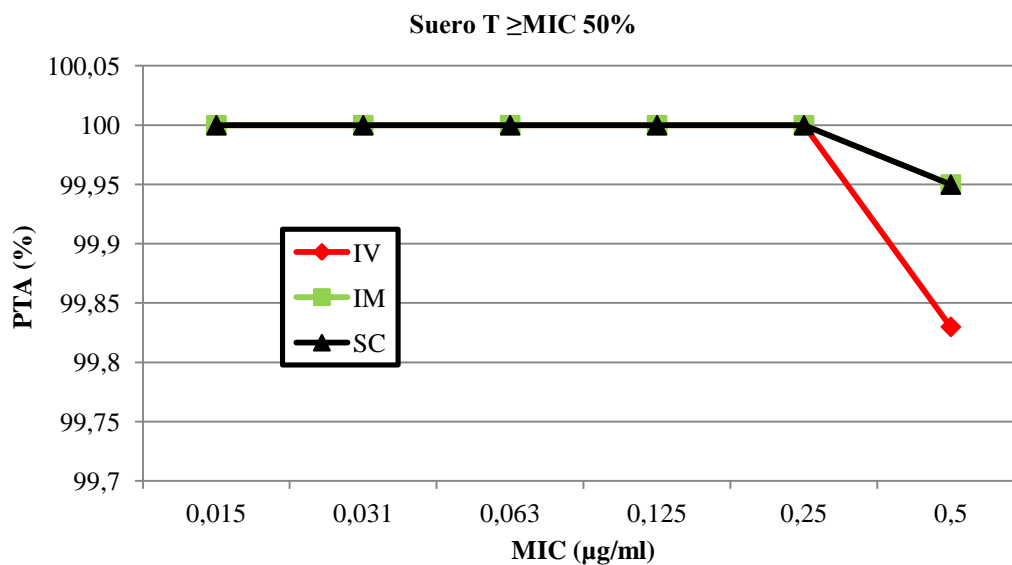


Figura 17: Probabilidad de alcanzar el probability of target attainment para un $T > \text{MIC} \geq 50\%$, en suero después de la simulación de Monte Carlo.

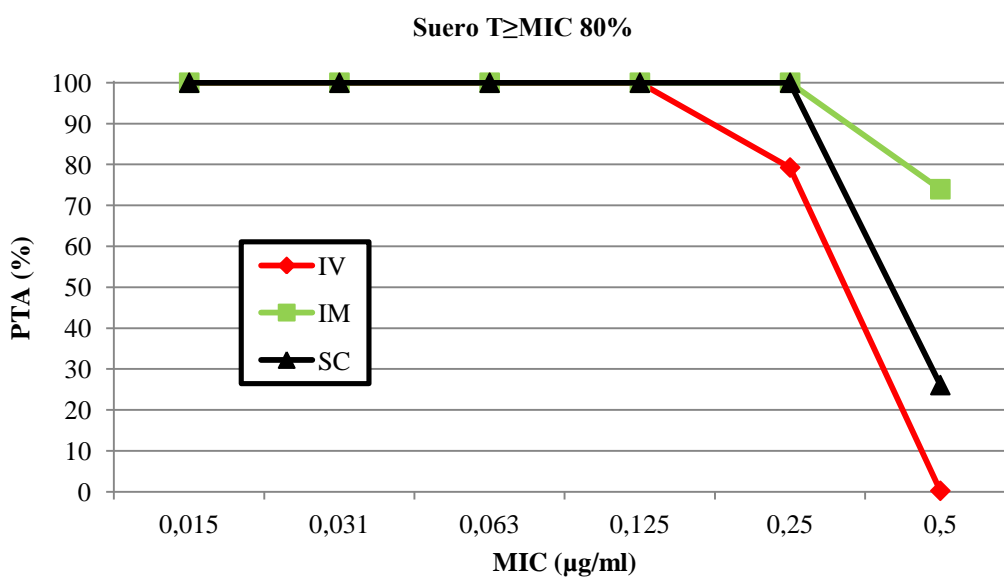


Figura 18: Probabilidad de alcanzar el probability of target attainment para un $T > \text{MIC} \geq 80\%$, en suero después de la simulación de Monte Carlo.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

V.1. DEL MATERIAL

Para la selección y manejo del material, se tuvieron en cuenta las recomendaciones que se describen en las siguientes directivas: Guideline on the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products 11 April 2011 EMA/CVMP/016/00-Rev.2 Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) y *Guía de seguridad en animales para los productos farmacéuticos veterinarios* (VICH GL 2/1998).

Estas guías proponen, entre otras consideraciones metodológicas, los aspectos que se deben tener en consideración en relación con los animales como son: especie, edad, raza, sexo, estado reproductivo, etc. También se incluyeron condiciones de bienestar animal, como el principio de las “3R” (reemplazo, reducción y refinamiento), que no son mutuamente independientes. Los animales utilizados para los ensayos fueron de raza Chaku, sanos, con un peso de $113 \pm 20,43$ kg (media \pm DE), machos castrados de 2 – 2,5 años. Con esta uniformidad se pretendía que los diferentes órganos implicados en los procesos cinéticos, especialmente los de eliminación (hígado y riñones), estuvieran completamente desarrollados y en general, las variaciones interindividuales que se produjeran en función del grado de desarrollo, sexo o raza se redujeran lo más posible. Por ello también se seleccionó el grupo de animales criados en las instalaciones de la UCC con condiciones uniformes de alimentación y manejo, además de estar controlados por los profesionales de guardia del Servicio de Clínica de grandes animales del Hospital Clínico Veterinario de la UCC. Esto aseguró que las llamas tuvieran su historia clínica registrada, con desparasitaciones, vacunaciones y antecedentes de medicación, de forma que se pudieran evitar las posibles interacciones farmacológicas durante el ensayo. Se utilizaron animales que habían sido castrados con anterioridad lo cual facilitó el proceso de manejo disminuyendo considerablemente la agresividad entre los mismos.

Para el estudio farmacocinético de CFQ por vía IV, IM y SC, se utilizó un diseño cruzado 3x2, con un periodo de lavado de 15 días, que se corresponde con un período equivalente de al menos 10 semividas de eliminación de CFQ, con el objeto de evitar la posible presencia de residuos concentraciones traza del medicamento procedente de las administraciones previas. Dado que las cefalosporinas no son consideradas como inductores enzimáticos, no se consideró la influencia que dicho efecto pudiera generar en los animales y por tanto se descartó en diseño en paralelo, ya que las guías anteriormente mencionadas, tan solo recomiendan este tipo de diseño para animales muy jóvenes en fase de desarrollo, en casos de clara inducción o inhibición enzimática, fármacos de semivida muy largas o formulaciones de acción retardada (*long acting*), cuestiones que no se daban en nuestro caso (EMA, 2009).

Debido a que diversas patologías podrían alterar los estudios farmacocinéticos, se consideró como criterio de exclusión del estudio el sufrir algún proceso morboso que pudiera influir en el resultado del mismo, por lo que se hizo especial hincapié en el estado sanitario de los animales, para ello antes de ser seleccionados se sometieron a un control sanitario completo.

Se utilizaron 6 animales, por considerar que es un número adecuado para realizar estudios farmacocinéticos de esta índole, siguiendo para su cálculo las indicaciones que diversos

autores refieren para estudios de bioequivalencia (Rani y Pargal, 2004; Hauschke *et al.*, 2007), de forma que se alcance una potencia de la prueba del 80% ($\beta=0,2$), una significación del 5% (error $\alpha=0,05$), una magnitud mínima de la diferencia a detectar (δ) del 20% y un coeficiente de variación basado en datos bibliográficos de otras cefalosporinas. Si bien en un primer momento se barajó la posibilidad de utilizar un número superior de animales considerando alguna posible baja durante la duración de las pruebas, al final se decidió trabajar con el menor número de llamas que fuera válido. Otros estudios farmacocinéticos han utilizado la misma cantidad de individuos, tanto en llamas (Rubio *et al.*, 2012; Kreil *et al.*, 2001 y 2012; Christensen *et al.*, 1996), camellos (Harron *et al.*, 1997; Aliabadi *et al.*, 2003; Abo-El-Sooud *et al.*, 2009) o en otras especies rumiantes (Litterio N.J., 2012; Shidu *et al.*, 2010; Dova *et al.*, 2007; Cárceles *et al.*, 2009), que son las más afines a los CSA.

Los medicamentos se utilizaron siguiendo las instrucciones provistas que el laboratorio elaborador recomienda para su almacenamiento y manipulación. El preparado para administración endovenosa se comercializa en forma de polvo liofilizado conteniendo 4,5 gr de cefquinoma sulfato. La presentación provee el solvente (100 ml de volumen) para la reconstitución y además un dispositivo que interconecta ambos frascos para realizar la mezcla sin ningún error. Esta forma farmacéutica no admite el uso de ninguna otra solución para la reconstitución que no sea la provista por el laboratorio fabricante. El preparado para administración IM y SC se presenta en forma de suspensión a una concentración de 2.5%. En todo momento los medicamentos se mantuvieron en cajas cerradas y a una temperatura entre 15 y 25°C.

De igual forma se utilizó el equipamiento para la detección y procesamiento de las muestras, según en las recomendaciones de diferentes guías para en las “Buenas prácticas de laboratorio” (GLP: DEPC 2004/9/EC 11; GCP: CVMP/VICH/595/98-FINAL, VICH 1998^a) con revisión y mantenimiento periódico.

V.2. DEL MÉTODO

V.2.1. ETAPA I: IMPLANTACION DE CAJAS TISULARES

La implantación de las cajas tisulares tuvo como principal objetivo la obtención de líquido tisular para cuantificar las concentraciones de CFQ en dicho medio. Las primeras experiencias realizadas con este tipo de cajas tenían como misión medir la presión en el líquido intersticial. Guyton A.C. (1963), concluyó que el fluido tisular se encuentra en comunicación con el homónimo del espacio extracelular. Otros autores como Bergan, T., (1981) y Clarke, C.R. (1989) concluyeron que las cajas tisulares implantadas subcutáneamente contenían un fluido conocido como trasudado, que no es idéntico en composición al fluido intersticial, pero por su continuidad puede ser considerado como representante de un compartimiento profundo y periférico. Por otro lado, los estudios de distribución de antimicrobianos demostraron que la C_{max} en el líquido tisular, frecuentemente era menor del 50% de la observada en suero (Chisholm *et al.*, 1973). En nuestro caso, el método fue válido ya que se obtuvo líquido tisular en cada una de los implantes en cantidad suficiente, lo que posibilitó la toma de muestra en cada tiempo prefijado y tras su análisis,

concentraciones mensurables de CFQ. La razón por la cual se tomaron 0,5 ml de cada caja tisular en cada tiempo de muestreo, tuvo por objetivo extraer un volumen pequeño (3,33% del volumen de la caja tisular) a los fines de permitir una restitución del fluido tisular perdido después del muestreo y que se alcance un equilibrio entre la concentración de CFQ del compartimiento extracelular y el líquido tisular.

V.2.1.1. Metodología analítica

Existen variadas técnicas para detectar y cuantificar betalactámicos en suero u otras matrices biológicas, siendo las más frecuentes para estudios farmacocinéticos el método microbiológico de difusión en agar o método de Bennett (Bennett *et al.*, 1966), y la cromatografía líquida de alta eficacia (*High Performance Liquid Chromatography* o HPLC), existiendo en general una buena correlación entre los resultados de ambas metodologías (Guerra *et al.*, 2005; Mendez *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2006; Bergold A.M., 2007; Schmidt *et al.*, 2009).

En el trabajo de Lorenzutti A.M., (2009) se analizaron muestras séricas de marbofloxacin a través del método microbiológico, el cual no presentó diferencias significativas, con respecto a la técnica de HPLC/uv. Esto se evidencio tanto en las concentraciones séricas como en los parámetros farmacocinéticos resultantes. Si bien las variaciones intra e interdía fueron mayores con el método de Bennett, no obstante se adecuaron a las exigencias de validación de la EMEA (2000). Por otra parte, el método de Bennett resulta ser más económico y simple que el método de HPLC/uv debido a que utiliza insumos de menor costo y además un menor volumen de muestra. En contrapartida, el método posee mayor variabilidad intrínseca y presenta la limitación de no poder discriminar metabolitos con actividad antimicrobiana, lo que limita su aplicación a la determinación de antimicrobianos sin metabolitos activos. Dado que la CFQ no produce metabolitos con actividad antimicrobiana, el método de Bennett pudo utilizarse sin problemas.

En nuestro trabajo, los límites de cuantificación y de detección (0,125 y 0,058 µg/ml, respectivamente) obtenidos con el método microbiológico fueron superiores a los reportados con HPLC/uv por otros autores como Zhang *et al.*, (2007); Li *et al.* (2008); Winther *et al.* (2011) y Zonca *et al.* (2011), con límites de detección entre 0,001 y 0,01 µg/ml, y de cuantificación generalmente de 0,01 µg/ml. Esta diferencia también fue observada por Lorenzutti A.M. (2009) que determinó concentraciones de marbofloxacin de muestras séricas mediante ambos métodos. Esto podría ser debido a que el método microbiológico de Bennet posee una variabilidad intrínseca mayor en comparación con el método cromatográfico. De todas maneras el límite de cuantificación observado en el presente trabajo, fue inferior a los valores de MIC de la mayoría de los patógenos.

No obstante estos resultados de validación han sido suficientes para los objetivos que nos planteamos en esta tesis y reúnen las exigencias en cuanto la linealidad, precisión y exactitud acorde a la normativa de validación GL 2, del programa VICH (1998b) mencionados en materiales y métodos, así como también, con los incluidos en los

procedimientos de validación para métodos bioanalíticos, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, de la Agencia Europea del Medicamento (2009).

V.2.2. ETAPA II: FARMACOCINETICA DE CEFQUINOMA EN SUERO Y LÍQUIDO TISULAR POR VÍA INTRAVENOSA, INTRAMUSCULAR Y SUBCUTÁNEA EN LLAMAS

V.2.2.1. Elección de la dosis y vías de administración

Las dosis de CFQ en las diferentes fuentes bibliográficas consultadas son variables, según la especie de destino, vía de administración y objetivos planteados. El laboratorio fabricante recomienda su uso a una dosis de 1 mg/kg para el tratamiento de enfermedades respiratorias causadas por *P. multocida* y *M. haemolytica*, dermatitis interdigital, necrobacilosis interdigital y mastitis aguda causada por *E. coli* con síntomas sistémicos en bovinos adultos; en infecciones respiratorias causadas por *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* e infecciones bacterianas severas con alto riesgo de septicemia causada por *E. coli* en caballos y potrillos. Por otra parte, el fabricante recomienda una dosis de 2 mg/kg para el tratamiento de septicemias en terneros, enfermedades respiratorias, síndrome mastitis-metritis-agalactia, meningitis, artritis y epidermitis en cerdos adultos y lechones.

En otros estudios, también se utilizó el mismo intervalo de dosis (de 1 o 2 mg/kg) independientemente de la vía de administración (IV o IM), en diferentes especies: cerdos (Block *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008), cabras (Errecalde *et al.*, 2001), ovejas (Tohamy M.A., 2011), terneros (Errecalde *et al.*, 2002), caballos (Winther *et al.*, 2011), camellos (Al-Taher A., 2010) y pollos (El-Gendy *et al.*, 2009). En cambio, Limbert *et al.*, (1991) emplearon 5, 10 y 20 mg/kg en perros, cerdos y vacas por las vías IV, IM o SC.

En esta tesis se decidió utilizar una dosis de 2 mg/kg. La elección de la misma se realizó basándose en el desconocimiento del comportamiento farmacocinético de la CFQ en llamas, por lo que se seleccionó la dosis más alta recomendada para maximizar la probabilidad de alcanzar concentraciones adecuadas durante el tiempo necesario para lograr la eficacia clínica y microbiológica frente a la mayoría de los patógenos en esta especie.

En esta tesis se incluyó la vía IV ya que es la más indicada para estudiar el comportamiento farmacocinético de un fármaco, permitiendo definir los procesos de distribución y eliminación (los cuales no están aún determinados en llamas), así como también para poder establecer la biodisponibilidad absoluta de otras vías de administración. Si bien no es la que normalmente se utiliza clínicamente para el tratamiento de infecciones, salvo casos de gravedad que requieran una administración continua o garantizar la llegada total del fármaco a sangre evitando problemas de absorción. En nuestro trabajo se empleó la vena yugular izquierda, con el fin de evitar equivocaciones y realizar la toma de muestras en ese lado.

Por otra parte, las vías IM y SC fueron incluídas en este estudio por ser habitualmente empleadas en clínica (principalmente por razones de practicidad) y porque son las

recomendadas por el laboratorio responsable de la comercialización. Concretamente, la vía SC, presentaría menos problemas que la vía IM, ya que generalmente es menos dolorosa y si se produce algún enquistamiento o lesión, no daña piezas musculares de valor comercial.

V.2.2.2. Diseño experimental

En las etapas donde hubo intervención experimental sobre los animales, se respetaron las normativas recomendadas por las guías descritas (EMEA/CVMP/133/99 Final; EMA/CVMP/016/00-Rev.2; VICH GL 43/2008). En cada una de ellas se realizaron diseños experimentales cruzados entre las vías IV, IM y SC con períodos de lavado no inferior a los 15 días, superior al recomendado: 4 a 8 semividas de eliminación (EMEA/CVMP/016/00-corr-FINAL, 2000).

V.2.2.3. Elección del modelo farmacocinético

Los perfiles de concentración *vs* tiempo de CFQ en suero y líquido tisular, fueron analizados por diferentes modelos farmacocinéticos. Con el fin de estudiar más detalladamente los procesos de distribución y eliminación de la CFQ en esta especie, que hasta donde conocemos no había sido descrito, las concentraciones séricas de CFQ por vía IV se analizaron con un modelo compartimental, concretamente utilizando un modelo bicompartimental, con y sin ponderación, a fin de establecer el mejor ajuste. Se siguieron los criterios de Akaike, Schwarz, el índice de correlación de Pearson y estándar de residuales que indican la relación entre los datos observados y los predichos por el modelo. Por otra parte, se realizó un análisis no compartimental a los perfiles de concentración *vs* tiempo de CFQ en suero y líquido tisular tras la administración IV, IM y SC, ya que proporciona datos más robustos y con menos artificios matemáticos, y permite estimar los parámetros farmacocinéticos basándose en datos objetivos, sin necesidad de ajustarlos a un modelo determinado (Kinabo y McKellar, 1989; Riviere, J., 2011).

V.2.2.4. Farmacocinética de la cefquinoma en suero y líquido tisular por vía intravenosa

V.2.2.4.1. Farmacocinética de la cefquinoma en suero por vía intravenosa

Tras la administración de CFQ (2 mg/kg) por vía IV (Figura), se observó un perfil concentración vs tiempo típico, correspondiente a un proceso farmacocinético de primer orden, que obedece a la ley de Fick, donde la tasa de difusión de un compuesto a través de una membrana es directamente proporcional a su gradiente de concentración, su coeficiente de partición lípido/agua y su coeficiente de difusión (Riviere, J., 2011, Papich, M.G., 2014).

El AUC_{∞} y AUC_{0-t} observado en nuestro estudio fue de $37,61 \pm 6,21 \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ y de $37,14 \pm 6,17 \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$, respectivamente. La diferencia entre ambas AUC fue inferior al 5%. Dado que el AUC_{∞} es proporcional a la dosis administrada, para poder comparar nuestro resultado, es necesario corregir el AUC de los diferentes trabajos por la dosis utilizado en cada de ellos. En la Tabla 30 se presentan las relaciones $AUC_{\infty}/\text{dosis}$ de CFQ para diferentes especies de interés veterinario. Como puede observarse en la Tabla , los valores $AUC_{\infty}/\text{dosis}$ observados en esta tesis fueron superiores en la mayoría de los casos a los reportados por otros autores. Teniendo en cuenta que $AUC = \text{dosis}/\text{Cl}$ (Riviere, J., 2009), y asumiendo que la relación entre la dosis y el AUC_{∞} responde a un proceso lineal a las dosis utilizadas, podríamos inferir que el mayor valor de la relación AUC/dosis observado en las llamas se debería a un menor aclaramiento corporal total en esta especie ($0,054 \text{ L.kg/h}$) respecto al observado en otras especies animales (Tabla 30).

Tabla 30: Valores de AUC_{∞} , dosis, relación $AUC_{\infty}/\text{dosis}$ y aclaramiento total de cefquinoma por vía intravenosa reportados en llamas (nuestro estudio) y en diferentes especies de interés veterinario.

Especie	AUC_{∞} ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)	Dosis (mg/kg)	Relación $AUC_{\infty}/\text{dosis}$	Cl ($\text{L}/\text{kg} \cdot \text{h}$)
Llamas	$37,61 \pm 6,21$	2	$18,80$	$0,05 \pm 0,01$
Bovinos^a	$84,7 \pm 25,3$	10	8,47	$0,16 \pm 0,06$
Ovinos^b	$5,83 \pm 0,45$	2	2,91	$0,34 \pm 0,03$
Caprinos^c	$8,02 \pm 0,63$	2	4,01	$0,25 \pm 0,02$
Caprinos^d	$33,83 \pm 2,53$	2	16,91	$0,06 \pm 0,01$
Cerdos^e	$66,7 \pm 27,2$	2	33,35	$0,13 \pm 0,06$
Cerdos^f	$8,07 \pm 1,91$	2	4,03	$0,26 \pm 0,08$
Cerdos^g	$21,90 \pm 5,52$	2	10,95	$0,10 \pm 0,03$

a, e: Limbert *et al.*, 1991; b: Uney *et al.*, 2011; c: Litterio N.J, 2012; d: Dumka *et al.*, 2013; f: Li *et al.*, 2008 g: Zhang *et al.*, 2014.

El volumen de distribución (Vd) expresa la capacidad de difusión de una molécula hacia los tejidos y secreciones orgánicas. En la literatura científica se presentan diferentes volúmenes de distribución, basándose en el momento en que se calcula cada uno de ellos : el volumen del compartimiento central (V_c), el volumen de distribución calculado por el método de área (Vd_{área}; también denominado Vz) y el volumen de distribución en estado estacionario (Vd_{ss}) (Toutain y Bousquet-Melou, 2004d).

El Vd_{área} o Vd en estado de pseudo-equilibrio o fase terminal (fórmula 2), se obtiene cuando el intercambio de fármaco entre el compartimiento central (plasma) y el resto del organismo es cero, y la disminución de la concentración plasmática del fármaco se debe exclusivamente a procesos de eliminación.

Por otra parte, el Vd_{ss} se calcula cuando los procesos de distribución y eliminación alcanzan el estado de equilibrio. El mismo se define como el Vd en un punto donde la tasa de eliminación es igual a la de distribución, de esta forma es afectado por la capacidad de eliminación del organismo, y se utiliza para predecir fluctuaciones de las concentraciones plasmáticas durante intervalos de administración intermitentes (Fórmula 3). Por lo tanto, el verdadero valor del Vd_{ss} se observa cuando se alcanza el estado de equilibrio en administraciones múltiples o en infusiones por vía IV (Toutain y Bousquet-Melou, 2004d).

Formula 2:

$$Vd_{\text{área}} = \frac{\text{Cantidad de fármaco en el organismo a tiempo durante la fase terminal}}{\text{Concentración plasmática durante la fase terminal}}$$

$$Vd_{\text{área}} = Cl / \lambda_e \quad Vd_{\text{área}} = \text{Dosis} / \lambda_e \cdot AUC$$

Formula 3:

$$Vd_{ss} = \frac{\text{Dosis}_{IV} \times AUMC}{(AUC)^2} = Cl \times MRT$$

Donde

AUC: área bajo la curva.

λ_e : pendiente de eliminación

AUMC: es el área bajo el primer momento de la disposición en la curva.

Cl: es el aclaramiento sérico total.

MRT: tiempo medio de residencia en el organismo.

Los valores observados de $V_{d_{area}}$ y $V_{d_{ss}}$ en nuestro estudio ($V_{d_{area}}$ $0,18 \pm 0,04$ y $V_{d_{ss}}$ $0,104 \pm 0,01$ l/kg), fueron similares a los reportados por otros autores en diferentes especies para CFQ y otras cefalosporinas (Tabla 7 y 8).

De todas maneras, los valores relativamente bajos observados del volumen de distribución no indican necesariamente que el pasaje de la CFQ a espacios extravasculares sea bajo. Como veremos más adelante cuando se analicen las concentraciones en el líquido tisular, el AUC_{∞} de CFQ fue mayor en líquido tisular tras la administración IM y SC, mientras que alcanzó el 60% para la vía IV. Por otra parte, es importante tener en cuenta que, si bien el volumen de distribución representa la magnitud de los procesos de distribución de un fármaco en el organismo, también puede ser influenciado por el aclaramiento plasmático total (Toutain y Bousquet-Melou, 2004d).

Además, existen diversos estudios de ATMs en diferentes especies animales que muestran que la unión a proteínas plasmáticas es un factor determinante de las concentraciones del fármaco en el fluido extracelular (Bidgood y Papich, 2002). La CFQ presenta un bajo porcentaje de unión a proteínas plasmáticas, entre el 5-15% en bovinos, caninos, porcinos y ovinos (Limbert *et al.*, 1991; EMEA, 1995; Tohamy, M.A., 2011) y entre 20–30 % en equinos (Winther *et al.*, 2011). Esto permitiría establecer un rápido equilibrio entre las concentraciones de CFQ en la sangre y los líquidos extravasculares, fundamentalmente a nivel del intersticio.

Esto fue observado en un estudio realizado por Davis *et al.* (2005) con cefalexina en caballos donde, pese al escaso $V_{d_{ss}}$ (0,25 l/kg), mostró una acumulación en fluido intersticial mayor al 80% y los autores asocian estos resultados a la elevada fracción de cefalexina libre en plasma del 77%. Esta característica es importante desde un punto de vista de eficacia clínica ya que, si bien las cefalosporinas no se concentran intracelularmente (Brown y Percival, 1978), son numerosas las infecciones bacterianas que asientan en el medio extracelular y en ese punto las concentraciones alcanzadas permiten unos mejores índices de eficacia basándonos en el fármaco libre.

El pasaje de la CFQ libre desde la sangre hacia el intersticio, probablemente ocurra a través de espacios entre las células del endotelio capilar o de los poros presentes en el mismo (dependiendo del tipo de capilares, ya sea fenestrado, continuo o sinusoidal), puesto que existen otros factores, además de la unión a proteínas plasmáticas, que regulan la tasa de difusión de un fármaco a través de la membrana. Entre las que se citan en la bibliografía como las más influyentes, se encuentran el tamaño de la molécula, la solubilidad a través de membranas y el grado de ionización (Riviere, J., 2009). Teniendo en cuenta que la CFQ es una molécula hidrofílica que posee un pKa de 2,7 y al interactuar con el plasma cuyo pH es de 7,4, según la aplicación de la ecuación de Henderson-Hasselbalch, genera un cambio en el equilibrio existente entre las formas no ionizadas e ionizadas a favor de esta última. Por lo tanto en el plasma predomina la forma polar de CFQ y sumado a su característica hidrofílica, dificulta su paso a través de la porción fosfolipídica de las membranas celulares, lo que explicaría por qué la CFQ no puede difundir fácilmente al espacio intracelular.

Los parámetros que caracterizan a los procesos de eliminación de fármacos son el aclaramiento (Cl), la semivida de eliminación ($t_{1/2\lambda_e}$) y el tiempo medio de residencia (MRT). El aclaramiento es el más importante de los parámetros de eliminación, ya que mide la capacidad total del organismo para eliminar el fármaco. El aclaramiento de plasma se define a menudo como el volumen de plasma que se libera totalmente del fármaco por unidad de tiempo (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004b). Se puede definir como una relación entre dos términos, la capacidad de eliminación del fármaco y la correspondiente concentración. Además del Cl, la semivida de eliminación nos da una idea de la capacidad de eliminación del organismo. La misma se define como el tiempo que tarda en reducirse a la mitad la concentración plasmática, después de alcanzar el pseudoequilibrio de distribución. Es decir, se mide cuando toda disminución en la concentración plasmática se debe solamente a procesos de eliminación. Otro parámetro de importancia es el MRT, que expresa la persistencia total del fármaco en el organismo (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004c).

El Cl observado para CFQ en este estudio ($0,054 \pm 0,01$ L/kg*h) fue ligeramente más bajo que el filtrado glomerular reportado en camélidos de $0,079 \pm 0,01$ L/kg*h (Kamili *et al.*, 2013). Debido a que CFQ se elimina fundamentalmente por vía renal sin metabolización previa, los datos obtenidos sugieren que tanto la filtración como la secreción tubular podrían estar involucrados en la excreción renal del antimicrobiano. Este valor es aparentemente similar al reportado para otras cefalosporinas en camellos, cabras y llamas (Tabla 9), pero es aparentemente inferior al observado en otras especies con CFQ (Tabla 10). Esto indica que el tiempo de permanencia del fármaco en el organismo es mayor en las llamas en comparación con otras especies, hecho que pudiera estar relacionado un menor aclaramiento renal del fármaco. Los camélidos son capaces de pasar muchas horas en condiciones de privación de agua y ello pudiera afectar a la cinética de eliminación de estos animales. Kreil *et al.* (2001) indicaron que las llamas tienen menor capacidad de excreción para la ampicilina.

El aclaramiento desde un punto de vista fisiológico, depende del gasto cardíaco (principalmente nos interesa la suma de los flujos de cada uno de los órganos implicados en la eliminación, fundamentalmente hígado y riñón) y de la capacidad de extracción de esos órganos. De forma que $Cl = Q * E$, siendo Q el flujo de sangre que llega a los órganos de eliminación y E una relación de extracción $(C_{in} - C_{out}) / C_{in}$ que implica las concentraciones de entrada y salida del fármaco de dicho órgano (Tozer y Rowland, 2006). El gasto cardíaco depende, en gran medida, del peso corporal, corrigiéndose en escala alométrica: $Q = 180 * P^{-0,19}$, siendo P el peso corporal en kg. En nuestro caso de las llamas, $Q = 70,2$ mL/kg/min. Por tanto para un Cl de $0,054$ L/kg*h, ($0,9$ mL/kg*min) la capacidad de extracción E sería de $0,012$, es decir de un 1,2%, considerándose un valor bajo (alto = $0,35$; medio = $0,15$; bajo = $0,05$, según Toutain y Bousquet Melou 2004b; Tozer y Rowland, 2006), pero si hacemos los cálculos para el resto de especies mencionadas anteriormente, comprobamos que se encuentra en mismo orden ya que no llegarían al 5% de capacidad de extracción. Debido a este factor es por lo que se pueden producir las diferencias en el aclaramiento en las diferentes especies.

Por otra parte Toutain y Bousquet Melou (2004b) indican que estos valores deberían ser modificados, considerando que el hígado y el riñón son los principales órganos que participan en el Cl total corporal; por lo tanto y teniendo en cuenta que el flujo sanguíneo que llega a estos órganos es del 50% del gasto cardíaco (riñón 20% e hígado 30%), los respectivos

valores de E ahora serían de 0,05 (el 50% de 0,1), 0,15 (el 50% de 0,3) y 0,35 (el 50% de 0,7). Con este mismo razonamiento, si consideramos para el caso de la CFQ la eliminación renal, se debería contemplar sólo el 20% del flujo sanguíneo que llega al riñón. Por tanto, ahora los valores de E para indicar si la extracción es baja, mediana o alta serían de 0,02 (el 20% de 0,1), 0,06 (el 20% de 0,3) y 0,14 (el 20% de 0,7), respectivamente. Concluyentemente, en cualquier caso, nuestro E calculado (0,012) indicarían que la CFQ en llamas pose una baja extracción renal (o corporal).

Todas estas características, influyen sobre el filtrado glomerular, secreción y reabsorción tubular y por consiguiente en el aclaramiento renal que a su vez determina el Cl total corporal. Como se expuso anteriormente, en la difusión de las moléculas a través de una membrana referido a la relación entre el pKa y el pH, el pKa ácido de CFQ condiciona su rápida excreción renal en una orina alcalina, típica de las llamas y rumiantes en general, con valores de pH entre 7,2 a 8,0 (Smith y Sherman, 2009), ya que en este medio predominará la forma ionizada y consecuentemente se evitará que sea reabsorbida.

Los otros parámetros que caracterizan la eliminación (la $t_{1/2\lambda_e}=2,31\pm0,24$, y el $MRT_{\infty}=1,70\pm0,01$ h) también fueron semejantes al reportado para otras cefalosporinas en llamas (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) y para CFQ en otras especies animales similares (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). En nuestro estudio el MRT presento un valor mayor a la semivida de eliminacion, lo cual fue reportado en otras cefalosporinas en llamas y para CFQ en otras especies (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Las diferencias observadas entre los valores de MRT y $t_{1/2\lambda_e}$ de este estudio y los reportados por otros autores podrían deberse que la $t_{1/2\lambda_e}$ es un parámetros muy influenciado por el Vd y la fase de eliminación, mientras que el MRT representa la persistencia total del fármaco en el organismo (Toutain y Bousquet-Melou, 2004c). Desde el punto de vista fisiológico este hecho se puede explicar teniendo en cuenta que, cuanto más se distribuya un fármaco a sitios extravasculares o bien cuanto menor sea su Cl, más tiempo permanecerá en el organismo. El MRT es un parámetro que se calcula por la relación entre el AUC y el área bajo el momento estadístico de la curva (AUMC), por lo tanto considera una estimación de la persistencia total el fármaco en el organismo, y no exclusivamente durante la fase de eliminación.

V.2.2.5. Farmacocinética de la cefquinoma en líquido tisular por vía intravenosa

La disposición de CFQ en el líquido tisular por vía IV se puede observar en la (Figura 13).

El valor observado de AUC_{∞} y AUC_{0-t} en líquido tisular fue de $23,71\pm6,77$ y de $21,98\pm5,78$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, respectivamente, inferiores al sérico de $37,61\pm6,21$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, la relación de $AUC_{\infty}/\text{dosis}$ de 10,99, en concordancia con los resultados de Shan *et al.* (2014) en cebuinos ($AUC_{\infty}/\text{dosis}=10,82$) y Zhang *et al.* (2014) en cerdos ($AUC_{\infty}/\text{dosis}=8,47$).

La relación $AUC_{LT}/AUC_{\text{Sero}}$ de CFQ fue de $0,60\pm0,17$, inferior a la obtenida para las vías IM y SC. Esta diferencia podría deberse a que una fracción de la dosis total

administrada, se eliminaría tempranamente del compartimento central después de la administración intravenosa, por lo que esta fracción no estaría disponible para difundir al fluido intersticial. Otros autores reportan resultados similares para ceftazidima en ovejas (Rule *et al.*, 1991) y CFQ en cerdos (Zhang *et al.*, 2014).

La C_{\max} de CFQ en líquido tisular fue de $4,25 \pm 1,98$ $\mu\text{g/ml}$ y se alcanzó a las $1,25 \pm 0,88$ h postadministración. La relación $C_{\max\text{LT}}/C_{\max\text{Suero}}$ fue de $0,83 \pm 0,40$, en concordancia con la relación $AUC_{\text{LT}}/AUC_{\text{Suero}}$ descrita anteriormente. Zhang *et al.* (2014) reportaron en cerdos un valor de C_{\max} de $1,2 \pm 0,2$ $\mu\text{g/ml}$ alcanzadas a las $3,86 \pm 1,46$ h postadministración y una relación $C_{\max\text{LT}}/C_{\max\text{Suero}}$ 0,19. Estas diferencias podrían deberse a los tiempos de muestreo, ya que la relación $AUC_{\infty}/\text{dosis}$ y la relación $AUC_{\text{LT}}/AUC_{\text{Suero}}$ fue similar al obtenido en nuestro trabajo.

La $t_{1/2\lambda_e}$ y el MRT en líquido tisular fueron de $5,75 \pm 4,86$ h y de $4,08 \pm 0,90$ h, superiores a los observados en suero ($2,31 \pm 0,24$ h y $4,08 \pm 0,90$ h, respectivamente). Esto podría tener implicancias desde el punto de vista terapéutico siempre y cuando las concentraciones alcanzadas en el líquido tisular sean efectivas. Las relaciones $t_{1/2\lambda_e\text{LT}}/t_{1/2\lambda_e\text{Suero}}$ y $\text{MRT}_{\text{LT}}/\text{MRT}_{\text{Suero}}$ fueron de $2,65 \pm 2,44$ y $2,19 \pm 0,51$, respectivamente, indicando una mayor permanencia de CFQ en líquido tisular en comparación con el suero. Otros autores como Zhang *et al.*, (2014) y Shan *et al.* (2014) obtuvieron valores de $t_{1/2\lambda_e}$ ($11,72 \pm 4,35$ y $7,99 \pm 1,60$ h), MRT ($10,11 \pm 1,79$; Shan *et al.*, 2014) y relaciones $t_{1/2\lambda_e\text{LT}}/t_{1/2\lambda_e\text{Suero}}$ ($5,00$ y $3,25$) y $\text{MRT}_{\text{LT}}/\text{MRT}_{\text{Suero}}$ ($3,33$; Shan *et al.*, 2014) aparentemente superiores a los observados en nuestro trabajo.

Los resultados obtenidos indicarían un buen pasaje y permanencia de CFQ en líquido tisular, lo cual puede ser beneficioso desde el punto de vista terapéutico, ya que la mayoría de las infecciones radican en el fluido extracelular, y se trata de un ATM tiempo dependiente.

V.2.2.6. Farmacocinética de cefquinoma en suero y líquido tisular por vía intramuscular y subcutánea

V.2.2.6.1. Farmacocinética de cefquinoma en suero por vía intramuscular y subcutánea

Tras la administración de CFQ (2 mg/kg) por vía IM y SC (Figura 13), se observó un perfil concentración vs tiempo típico de una vía extravascular con una fase absorción, una concentración pico y una fase de distribución y eliminación.

El AUC_{∞} y el AUC_{0-t} observado tras una administración IM fue de $47,11 \pm 17,02$ y de $45,77 \pm 16,61$ $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$, mientras que para la vía SC fueron de $36,93 \pm 12,92$ y $34,65 \pm 12,98$ $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$, respectivamente, no observándose diferencias significativas entre las tres vías estudiadas (Figura 19). Si tenemos en cuenta la dosis utilizada (2 mg/kg), la relación $AUC_{\infty}/\text{dosis}$ para la vía IM fue de 23,55 y para la vía SC de 18,46. Como puede observarse en la Tabla 31, la relación $AUC_{\infty}/\text{dosis}$ fue mayor en llamas en comparación con la mayoría de las especies estudiadas, con excepción de los camellos en donde se reportó un valor similar, probablemente debido a similitudes fisiológicas entre esta especie y la llama. Si bien

el autor no reporta el valor de aclaramiento plasmático de CFQ en camellos, podríamos atribuir las diferencias con respecto a las demás especies, a un menor aclaramiento plasmático como ocurre en las llamas.

Tabla 31: Valores de AUC_{∞} , dosis, relación $AUC_{\infty}/\text{dosis}$ de cefquinoma por vía intramuscular y subcutánea reportados en llamas (nuestro estudio) y en diferentes especies de interés veterinario.

Especie	Vía	AUC_{∞} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	Dosis (mg/kg)	Relación $AUC_{\infty}/\text{dosis}$
<i>Llama</i>	IM	47,11±17,02	2	23,55
Bovino^a	IM	24,00	10	2,4
Ovino^b	IM	5,19 ±0,25	2	2,55
Ovinos^c	IM	9,25 ± 0,77	2	4,63
Cabra^d	IM	7,54 ± 0,58	2	3,77
Cabra^e	IM	19,82±2,07	2	9,91
Camello^f	IM	20,37±1,1	1	20,37
Cerdos^g	IM	17,79±7,64	2	8,89
Cerdos^h	IM	9,64± 0,44	1	9,64
Cerdosⁱ	IM	7,58 ± 1,59	2	3,79
<i>Llama</i>	SC	36,93±12,92	2	18,46
Ovinos^c	SC	6,96± 0,97	2	3,48

a: Limbert *et al.*, 1991; b: Uney *et al.*, 2011; c: Selvi Sabater M., 2015; d: Litterio N.J, 2012; e: Dumka *et al.*, 2013; f: Al-Taher A.Y., 2010; g: Zhang *et al.*, 2014; h: Shan *et al.*, 2014; i: Li *et al.*, 2008.

En general la biodisponibilidad absoluta de CFQ vía IM y SC en llamas fue completa (124±45% y 94±35%, respectivamente), similar a los reportado por Li *et al.* (2008), en cerdos (95,13±9,93 %), Uney *et al.* (2011) en ovejas (89,31±6,06 %), Zhang *et al.* (2014) en lechones (103,9±14,7 %), Shan *et al.* (2014) en cebuinos amarillos (104±7,13 %), Selvi Sabater, P., (2015) en ovinos (79,64±8,64%), Litterio, N.J. (2012) y Dumka *et al.* (2013) en cabras (94±1,37 % y 57,39±3,4 %, respectivamente).

Gran parte de las investigaciones publicadas con CFQ para la vía IM en distintas especies, lo han hecho sin contemplar la vía IV, por lo tanto no está disponible el valor de biodisponibilidad, pudiendo realizarse comparaciones con este parámetro en pocas publicaciones. Los valores de biodisponibilidad, para la vía IM en cabras, determinados en otras cefalosporinas como cefepima (Prawez *et al.*, 2010), cefotaxima (Atef *et al.*, 1990), ceftriaxona (Ismail, M.M., 2005) y cefuroxima (El-Sooud *et al.*, 2000) fueron superiores al 85 % en todos los casos. De esta manera, los datos de biodisponibilidad obtenidos en este estudio

y aquellos procedentes de la bibliografía indicarían que la CFQ presenta una buena biodisponibilidad vía IM y SC, de manera similar al resto de las cefalosporinas estudiadas.

El valor de C_{max} para la vía IM fue de $12,80 \pm 4,72$ $\mu\text{g/mL}$, observado a las $1,08 \pm 0,34$ h postadministración, mientras que el C_{max} de la vía SC fue de $12,49 \pm 3,28$ $\mu\text{g/mL}$ y se alcanzo a $1,04 \pm 0,49$ h postadministración. No se observaron diferencias significativas en la C_{max} entre las vías IM y SC, siendo ambas inferiores a la C_0 observada en la vía IV (Figura 20). Esto se debe a que la totalidad de la dosis administrada se administra directamente en la vasculatura, por lo que se alcanza una mayor concentración inicial. Cabe destacar que la concentración máxima tras la administración IV se extrapola a tiempo 0. Por otra parte no se observaron diferencias entre los valores de $t_{1/2\lambda}$, T_{max} (Figura 21) y MAT para vía IM y SC.

La relación entre la C_{max} y la dosis también es una indicador de los procesos de absorción de un fármaco, y puede estar influido por factores como la formulación, el flujo sanguíneo en el sitio de administración y las características físico-químicas de la molécula (principalmente la liposolubilidad y el grado de ionización). La relación entre la C_{max} /dosis para CFQ fue de 6,4 y 6,2 para las vías IM y SC, superior a los valores reportados por otros autores. CFQ presentó una mayor absorción relativamente rápida tras la administración IM y SC en comparación con los datos reportados en diferentes especies (Tabla 32).

Tabla 32: Valores de dosis, C_{max} , relación C_{max} /dosis y T_{max} de cefquinoma por vía intramuscular y subcutánea reportados en llamas (nuestro estudio) y en diferentes especies de interés veterinario.

Especie	Vía	Dosis (mg/kg)	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	T_{max} (h)	Relación C_{max} /dosis
Llama	IM	2	$12,80 \pm 4,72$	$1,08 \pm 0,34$	6,4
Camellos ^a	IM	1	$1,23 \pm 0,08$	$4,25 \pm 0,1$	1,23
Bovinos ^b	IM	1	$2,34 \pm 0,12$	$0,78 \pm 0,32$	2,34
Caprinos ^c	IM	2	$4,84 \pm 0,23$	1,5	2,42
Caprinos ^d	IM	2	$2,56 \pm 0,17$	$1,17 \pm 0,26$	1,28
Cerdos ^e	IM	2	$11,81 \pm 0,48$	$0,34 \pm 0,12$	5,9
Cerdos ^f	IM	2	$4,01 \pm 0,57$	$0,28 \pm 0,07$	2,05
Cerdos ^g	IM	2	$3,36 \pm 0,54$	$0,83 \pm 0,28$	1,68
Ovejas ^h	IM	2	$2,60 \pm 0,14$	0,50	1,30
Equinos ⁱ	IM	1	-	0,5 – 2	-
Llama	SC	2	$12,49 \pm 3,28$	$1,04 \pm 0,49$	6,24
Ovinos ^j	SC	2	$0,95 \pm 0,08$	$3,11 \pm 0,14$	0,47

a: Al-Taher A.Y, 2010; b: Limbert *et al.*, 1991; c: Dumka *et al.*, 2013; d: Litterio, N.J., 2012; e: Zhang *et al.*, 2014 f: Li *et al.*, 2008; g: Lu *et al.*, 2007; h: Uney *et al.*, 2011; i: Winther *et al.*, 2011; j: Selvi- Sabater, P., 2015.

De esta manera el C_{max} , T_{max} y la relación $C_{max}/dosis$, así como los valores de biodisponibilidad indican que CFQ presenta una rápida y completa absorción tras su administración vía IM y SC.

La $t_{1/2\lambda_e}$ y el MRT para la vía IM fueron $2,18 \pm 0,60$ h y $3,37 \pm 0,49$ h, mientras que para la vía SC fueron de $2,97 \pm 0,59$ h y $2,85 \pm 0,57$ h. Los valores de $t_{1/2\lambda_e}$ no presentaron diferencias entre las tres vías de administración, mientras que los resultados de MRT fueron mayores para las vías IM y SC con respecto a la vía IV (Figura y Figura). El valor fue similar al resultado obtenido por Selvi Sabater, P., (2015), con un valor de $2,32 \pm 0,25$ h (Tabla 33).

El valor de $t_{1/2\lambda_e}$ tras la administración IM ($2,18 \pm 0,60$ h) fue muy similar a los especies estudiadas con la excepción de los camellos, donde $t_{1/2\lambda_e}$ y MRT fueron superior a los observados en nuestro estudio, pudiéndose relacionarse a un menor aclaramiento plasmático en esta especie.

Tabla 33: Valores de dosis, $t_{1/2\lambda_e}$ y MRT de cefquinoma por vía intramuscular y subcutánea reportados en llamas (nuestro estudio) y en diferentes especies de interés veterinario.

Especie	Vía	Dosis (mg/kg)	$T_{1/2\lambda_e}$ (h)	MRT (h)
Llama	IM	2	$2,18 \pm 0,60$	$3,37 \pm 0,49$
Camellos ^a	IM	1	$10,24 \pm 0,8$	$16,74 \pm 0,9$
Bovinos ^b	IM	1	-	-
Caprinos ^c	IM	2	$5,86 \pm 0,29$	$8,08 \pm 0,50$
Caprinos ^d	IM	2	$1,76 \pm 0,26$	$2,73 \pm 0,20$
Cerdos ^e	IM	2	$13,08 \pm 3,48$	-
Cerdos ^f	IM	2	$4,36 \pm 2,35$	-
Cerdos ^g	IM	2	$2,78 \pm 0,20$	-
Ovejas ^h	IM	2	$1,88 \pm 0,40$	-
Equinos ⁱ	IM	1	-	0,5 – 2
Llama	SC	2	$2,97 \pm 0,59$	$2,85 \pm 0,57$
Ovinos ^j	SC	2	$1,84 \pm 0,19$	-

a: Al-Taher A.Y, 2010; b: Limbert *et al.*, 1991; c: Dumka *et al.*, 2013; d: Litterio, N.J., 2012; e: Zhang *et al.*, 2014 f: Li *et al.*, 2008; g: Shan *et al.*, 2014; h: Uney *et al.*, 2011; i: Winther *et al.*, 2011; j: Selvi- Sabater, P., 2015.

Finalmente la CFQ administrada vía IM y SC en llamas mostró una biodisponibilidad completa y una mayor permanencia en el organismo en comparación con la administración IV. Esto indicaría que tales vías de administración podrían ser una vía adecuada desde el punto de vista terapéutico en esta especie.

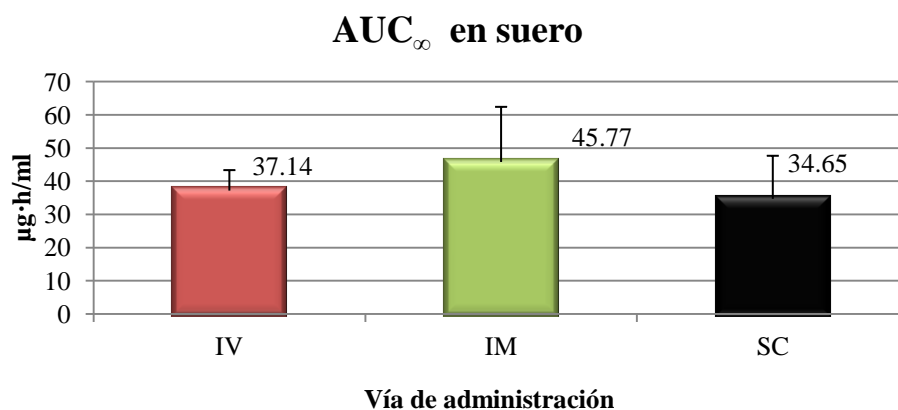


Figura 19: Comparación grafica de los AUC_∞ en suero entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutanea. No existen diferencias significativas.

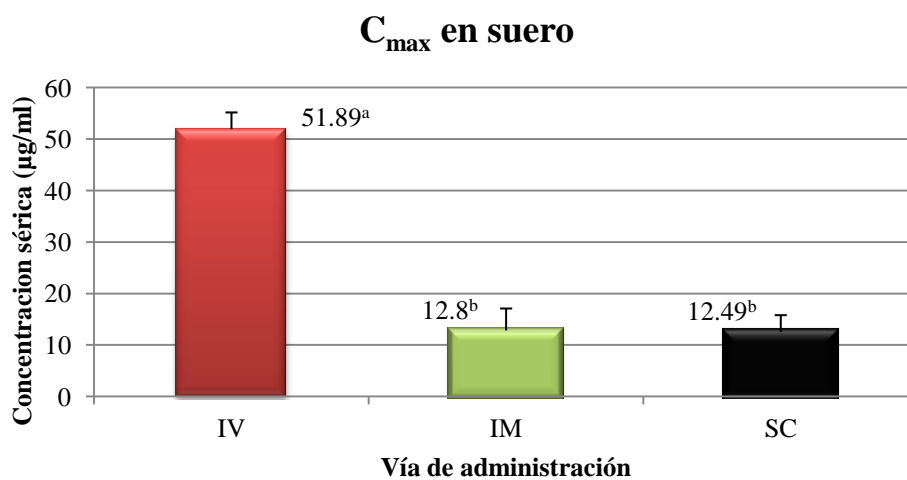


Figura 20: Comparación grafica de los C_{max} suero entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutanea. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutanea (p <0,05) ab: indica que no hay diferencias significativas con los otros dos grupos

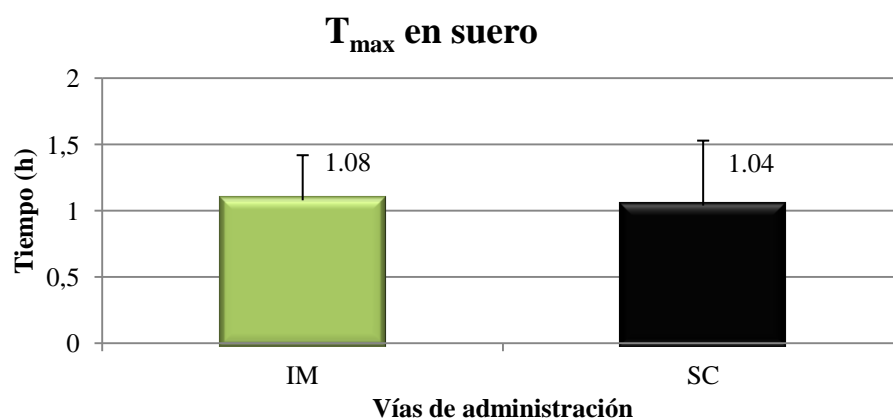


Figura 21: Comparación grafica de los T_{\max} en suero entre las vías de administración intramuscular y subcutánea. No existen diferencias significativas.

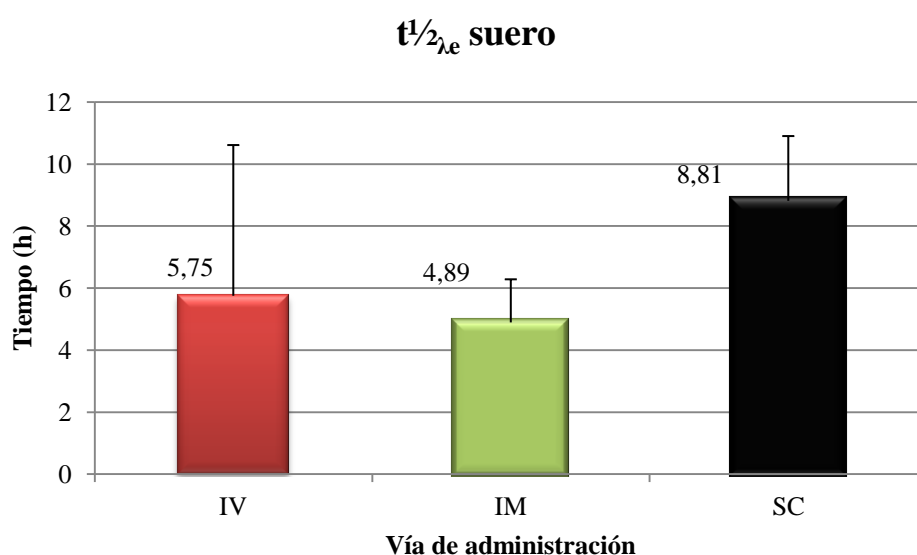


Figura 22: Comparación grafica de la $t_{1/2\lambda_e}$ en suero entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutánea. No existen diferencias significativas.

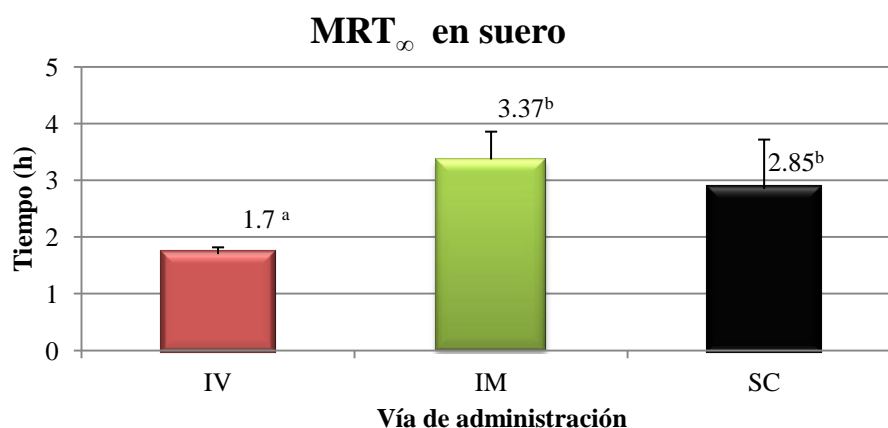


Figura 23: Comparación grafica de los MRT_{∞} en suero entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutánea. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutánea ($p < 0,05$) ab: indica que no hay diferencias significativas con los otros dos grupos

V.2.2.6.2. Farmacocinetica de cefquinoma en líquido tisular por vía intramuscular y subcutánea

La disposición de CFQ en el líquido tisular vía IM y SC se puede observar en la Figura 14.

Los valores de AUC_{∞} y AUC_{0-t} tras IM de CFQ fueron $85,40 \pm 52,14$ y $82,42 \pm 52,04$ $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$, mientras que tras la administración SC se observaron valores de $41,05 \pm 10,66$ y $37,65 \pm 10,76$ $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$. Solo la vía SC presentó valores de AUC_{∞} y AUC_{0-t} significativamente mayores que la vía IV, mientras que la vía IM no presentó diferencias ni con la vía SC e IV (Figura 24). Es importante destacar que si bien la vía IM presentó valores promedio de AUC mayores que la vía SC, la ausencia de diferencias estadísticas podría deberse a la gran variabilidad observada para esta vía de administración. La relación $AUC_{LT}/AUC_{\text{Suero}}$ de CFQ fue superior a la unidad para las vías IM y SC (Figura 29). Esto refleja que CFQ presentó una biodisponibilidad completa en LT por vías extravasculares. Zhang *et al.* (2014) y Shan *et al.* (2013) reportaron en cerdos y cebuinos valores de $AUC_{LT}/AUC_{\text{Suero}}$ aparentemente inferiores a los observados en este estudio. De manera similar, Rule *et al.* (1991) reportó valores de $AUC_{LT}/AUC_{\text{Suero}}$ de 0,63 y 0,46 para la vía IM y SC respectivamente.

Los valores de C_{max} para la vía IM y SC fueron de $8,39 \pm 5,80$ y $4,82 \pm 1,83$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se alcanzaron a $4,50 \pm 2,51$ y $4,00 \pm 1,55$ h. El valor de C_{max} no presentó diferencias significativas entre las diferentes vías (Figura), ya que probablemente una vez que CFQ alcanzó el compartimento central, difundió a la misma concentración hacia el líquido tisular. La relación $C_{\text{max}LT}/C_{\text{max}Suero}$ de CFQ fue <1 para las rutas IV y SC, pero ≈ 2 después de la administración IM (Figura 32). Esto podría ser explicado debido a la mayor biodisponibilidad que presenta la vía IM, tanto en suero como en líquido tisular. El T_{max} observado tras la administración IM y SC fue significativamente mayor que el obtenido por vía IV (Figura 26).

Esto podría ser explicado debido a que la vía IV carece de fase de absorción y provee mayores concentraciones séricas que las obtenidas tras las vías extravasculares, lo cual va a facilitar una difusión más rápida del antimicrobiano hacia el fluido extracelular.

Los valores de $t_{1/2\lambda_e}$ para las vías IM y SC ($4,89 \pm 1,39$ y $8,81 \pm 2,09$, respectivamente) no presentaron diferencias entre ellas (Figura 27), sugiriendo que, una vez que CFQ alcanza el líquido tisular, se elimina a la misma velocidad, aparentemente sin influencia de la vía de administración. Con respecto al MRT_{∞} , los valores para las vías IM y SC fueron de $7,72 \pm 1,14$ y $7,10 \pm 0,93$ h, mayores que el observado para la vía IV (Figura 28). Esto, probablemente, se deba a que tras la administración IM y SC, la fase de absorción prolonga la permanencia de la CFQ dentro del líquido tisular.

Por otra parte, los valores de la relación $t_{1/2\lambda_{eLT}}/t_{1/2\lambda_{eS}}_{uero}$ y la relación $MRT_{LT}/MRT_{S_{uero}}$ fueron ≈ 2 y no presentaron diferencias entre las tres vías estudiadas, indicando una mayor persistencia de CFQ en LT en comparación con el suero (Figura 30 y 31). Estos datos podrían determinar una mejor eficacia antimicrobiana de CFQ en este compartimento biológico con mayores valores de $T > MIC$ en LT. Hallazgos similares fueron reportados por otros autores como Zhang *et al.* (2014) en cerdos y Shan *et al.* (2013) en cebuinos.

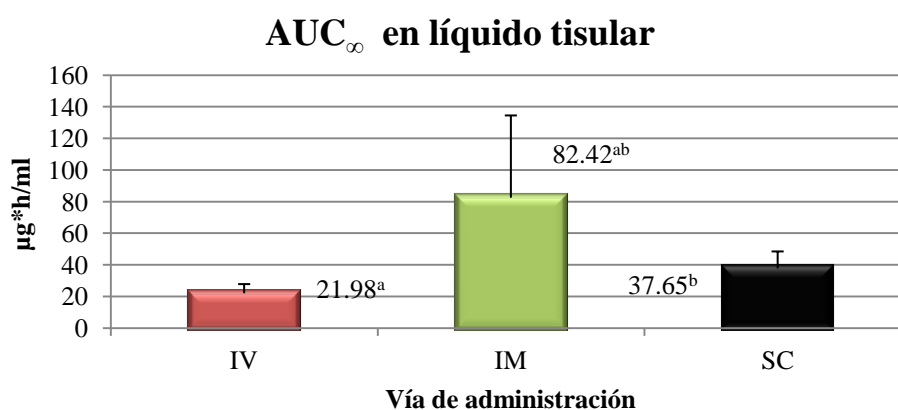


Figura 24: Comparación gráfica de la AUC_{∞} tisular entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutánea. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutánea ($p < 0,05$) ab: indica que no hay diferencias significativas con los otros dos grupos

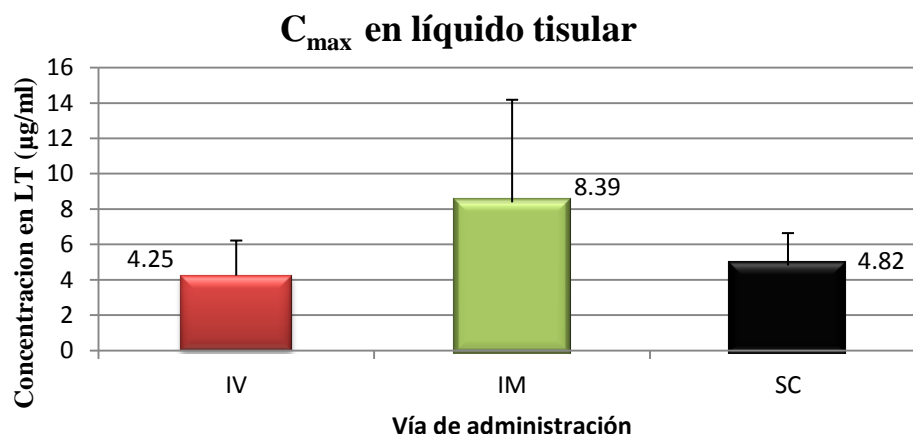


Figura 25: Comparación grafica de la C_{max} tisular entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutanea. No existen diferencias significativas.

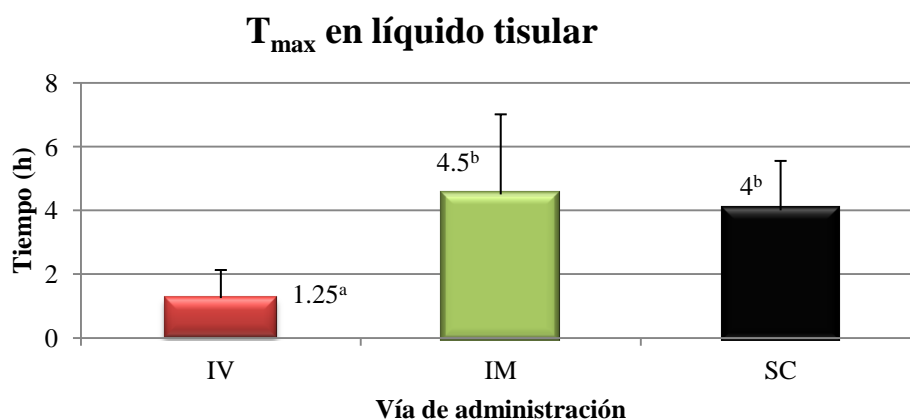


Figura 26: Comparación grafica de la T_{max} tisular entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutanea. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutanea ($p < 0,05$) ab: indica que no hay diferencias significativas con los otros dos grupos

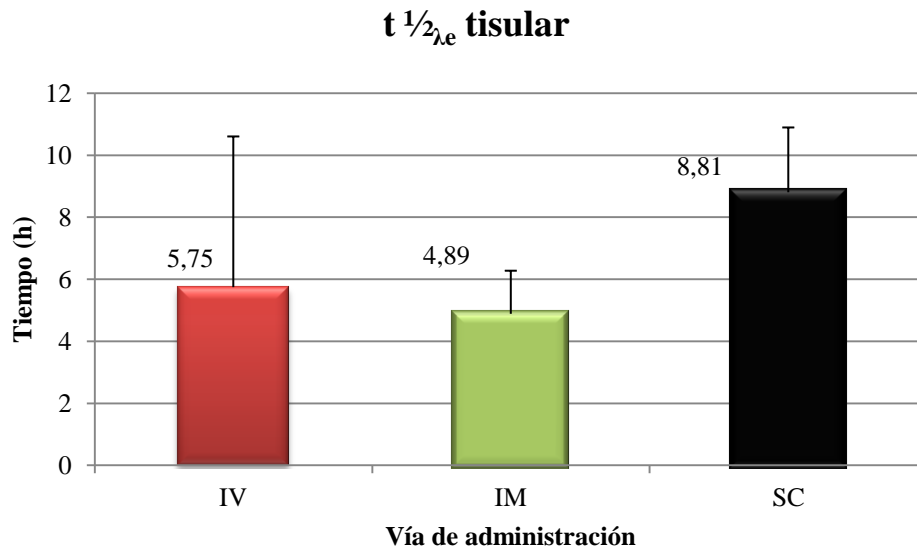


Figura 27: Comparación grafica de la $t_{1/2\alpha e}$ tisular entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutanea. No existen diferencias significativas.

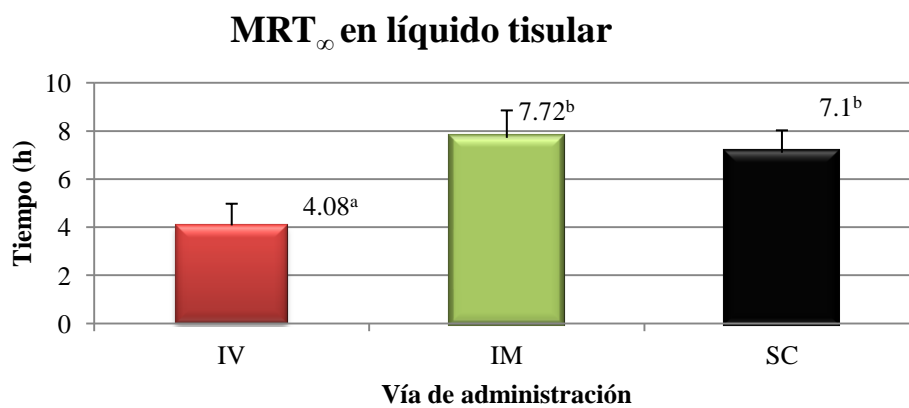


Figura 28: Comparación grafica de la MRT_{∞} tisular entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutanea. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutanea ($p < 0,05$) ab: indica que no hay diferencias significativas con los otros dos grupos

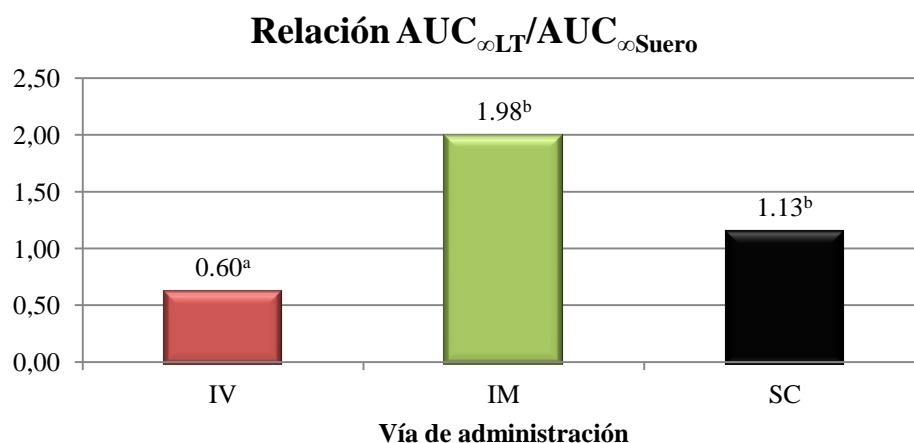


Figura 29: Comparación grafica de la relación AUC_{∞} en líquido tisular y AUC_{∞} sérica entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutánea. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutánea ($p < 0,05$) ab: indica que no hay diferencias significativas con los otros dos grupos

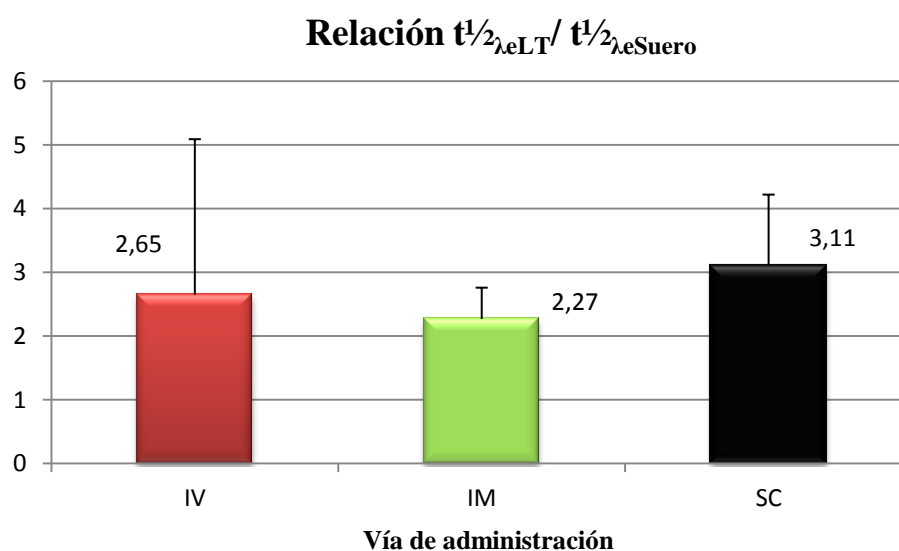


Figura 30: Comparación grafica de la relación entre $t_{1/2\lambda e}$ tisular y $t_{1/2\lambda e}$ sérica entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutánea. No existen diferencias significativas

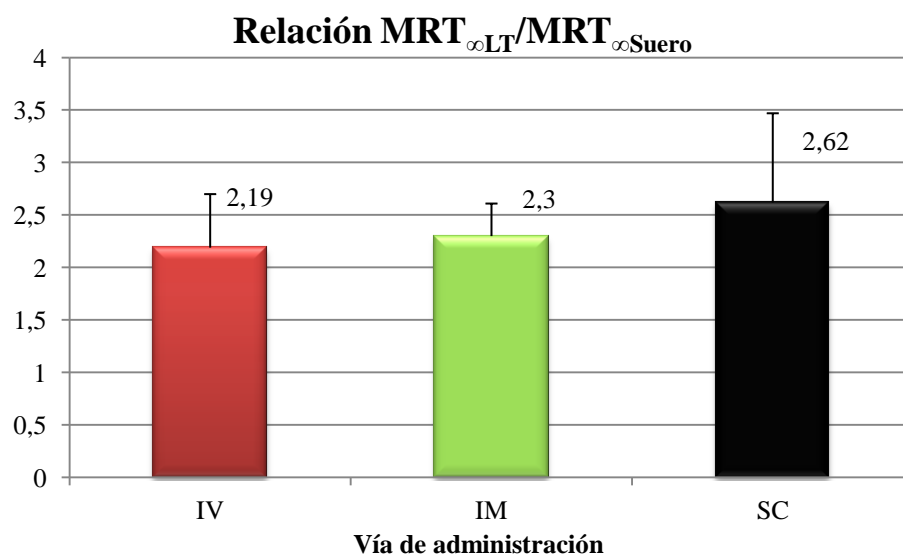


Figura 31: Comparación grafica de la relación entre el MRT_{∞} tisular y sérico entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutánea. No existen diferencias significativas

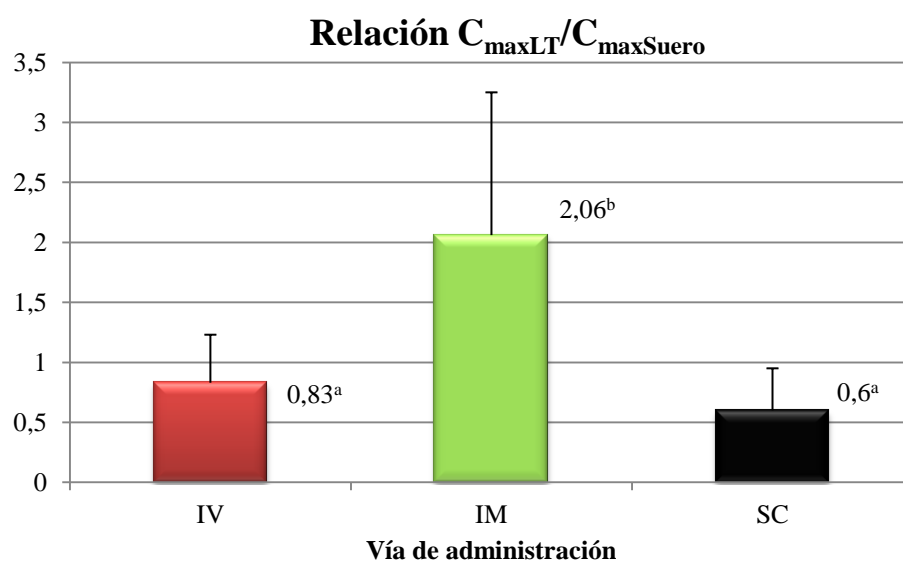


Figura 32: Comparación grafica de la relación entre el C_{max} tisular y sérico entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutánea. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutánea ($p < 0,05$) ab: indica que no hay diferencias significativas con los otros dos grupos

V.2.3. ETAPA III: MUESTREO MICROBIOLÓGICO Y DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACION INHIBITORIA MÍNIMA DE CEFQUINOMA EN CEPAS REGIONALES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *ESCHERICHIA COLI* EN LLAMAS ENFERMAS

En la actualidad, los datos de susceptibilidad de cepas patógenas para CFQ son limitados, particularmente en llamas. El objetivo de este muestreo no fue realizar un estudio epidemiológico, sino evaluar la sensibilidad antimicrobiana de patógenos regionales frente a CFQ. La CFQ, según los resultados de esta tesis, es un ATM eficaz *in vitro* frente a los patógenos aislados en llamas, en el caso de *Escherichia coli* con unos valores de MIC₅₀ 0,031 µg/ml y MIC₉₀ 0,063 µg/ml y en el de *Staphylococcus aureus* con valores de MIC₅₀ 0,25 µg/ml y MIC₉₀ 0,5 µg/ml.

Estos valores de MIC de patógenos aislados de llamas, fueron similares a los reportados por otros autores en diferentes especies. Los valores de MIC₉₀ para *E. coli* fueron <0,06 µg/ml (Sheldon *et al.*, 2004) y 0,50 µg/ml (Ganiere *et al.*, 2005) en bovinos, 0,07 µg/ml en terneros de búfalo (Dinakaran *et al.*, 2013) y 0,12 µg/ml para *E. coli* ATCC 25922 (Yang *et al.*, 2008). El valor de MIC₉₀ de CFQ fue de 0,25 µg/ml frente a *S. aureus* aislado de bovinos (Zonca *et al.*, 2011) y *S. aureus* ATCC 29213 (Wang *et al.*, 2014), mientras que Ganiere *et al.* (2005) reportaron valores más altos para este patógeno (0,5-1 µg/ml). El aumento en la relación MIC₉₀/MIC₅₀ está directamente relacionado con el desarrollo de mecanismos de resistencia en la población bacteriana (Higgins *et al.*, 2000).

Tanto las cepas de *E. coli* como las de *S. aureus* mostraron una distribución unimodal de las MICs y un MIC₉₀/MIC₅₀ = 2, lo que indica una relativamente baja aparición de resistencia en la población bacteriana analizada. Este efecto también se puede observar en las figuras 27 y 28, donde los porcentajes de cepas inhibidas por la CFQ en función de la MIC describen una distribución unimodal, a diferencia de las bimodales (donde se observan subpoblaciones intermedias) concomitantes con la evolución de mecanismos de resistencia (MacGowan y Wise, 2001; Bywater *et al.*, 2006). Existen diferentes trabajos que reflejan valores de MIC frente a diferentes patógenos en rumiantes (Tabla 34).

Tabla 34: Concentracion inhibitorias mínimas 90, para patógenos de importancia veterinaria en rumiantes.

Patógeno	MIC ₉₀ (µg/ml) (n)
<i>Escherichia coli</i> ^{1, 2, 6, 8}	≤ 0,250 (234)
<i>Escherichia coli</i> ⁷	1,000 (41)
<i>Enterobacter spp</i> ⁴	0,781 (40)
<i>Proteus mirabilis</i> ⁴	0,195 (27)
<i>Salmonella spp.</i> ^{1, 4}	≤ 0,500 (198)
<i>Citrobacter spp.</i> ⁴	0,195 (40)
<i>Mannheimia haemolytica</i> ^{1, 3, 9}	≤ 0,120 (221)
<i>Pasteurella multocida</i> ^{1, 5, 9}	≤ 0,120 (326)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ²	0,500 (98)
<i>Staphylococcus aureus / intermedius</i> ⁸	0,500 (11)
<i>Arcanobacterium pyogenes</i> ⁶	< 0,125 (22)
<i>Clostridium perfringens</i> ⁸	1,000 (10)

(n): número de cepas testadas. ¹Böttner *et al.* (1995), ²Deshpande *et al.* (2000), ³Katsuda *et al.* (2012), ⁴Limbert *et al.* (1991), ⁵Melnikow *et al.* (2008), ⁶Sheldon *et al.* (2004), ⁷Thomas *et al.* (2004), ⁸Thomas *et al.* (2006), ⁹Wallmann *et al.* (2003).

Si bien CLSI y EUCAST no han determinado aún los puntos de corte específicos para CFQ, han determinado los rangos de MIC para *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, los cuales son de 0,03–12 y 0,25–2 µg/ml,

respectivamente (CLSI, 2008). Por otra parte el punto de corte para cefepime (cefalosporina de cuarta generación) es de 1-4 µg/ml (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0, 2017). Teniendo esto en cuenta podríamos considerar que los patógenos analizados en esta tesis, presentan una adecuada sensibilidad a la CFQ.

Existe un trabajo de Zhou *et al.* (2016), en el cual se evalúa la correlación PK/PD de CFQ frente a una infección experimental de *S. aureus* productor de biofilm, asociada a un catéter endovenoso. Se evalúan diferentes parámetros de eficacia como MIC, concentración mínima inhibitoria en el biofilm (MICB), concentración bactericida en el biofilm (CBB), concentración mínima de erradicación en el biofilm (CMEB) y concentración preventiva de mutantes en el biofilm (CPMB). El trabajo concluye que la MIC y CPMC para CFQ en las 4 cepas utilizadas fueron casi idénticas (0,5 y 1-2 µg/ml, respectivamente). Esto indicaría que CFQ muestra una alta actividad antibacteriana *in vitro* en contra de *S. aureus* productor de biofilm y una habilidad potencial para prevenir la formación temprana de biofilms. Las MICB (16 µg/ml), CBB (32-64 µg/ml) y CMEB (64-256 µg/ml) de CFQ en relación a cepas de *S. aureus* dentro de los biofilms fueron significativamente más altas que el valor correspondiente de MIC. Los autores concluyen que se deberían formular nuevos preparados de CFQ, para alcanzar mejores índices terapéuticos en relación a las infecciones relacionadas con biofilms (Zhou *et al.*, 2016).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio revelan pocas diferencias en cuanto a los valores de MIC de CFQ frente a diferentes especies aisladas en rumiantes de otras regiones, lo cual pone en evidencia la necesidad de generar datos que sean relevantes en los rodeos de llamas que habitan nuestra provincia, muchas veces relegada ante otros sistemas productivos de mayor importancia económica.

V.2.4. ETAPA IV: ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO/FARMACODINÁMICO MEDIANTE SIMULACIÓN DE MONTE CARLO

Dado que los β -lactámicos presentan una actividad antimicrobiana tiempo dependiente, el parámetro PK/PD más utilizado para predecir la eficacia antimicrobiana es el tiempo durante el cual la concentración del antimicrobiano supera la MIC ($T_{>MIC}$), a diferencia de los agentes antimicrobianos concentración dependiente como las fluoroquinolonas, donde se sugiere el parámetro AUC/MIC y C_{max}/MIC . El punto de corte recomendado para lograr un efecto bactericida óptimo para antimicrobianos betalactámicos es un $T_{>MIC}$ de al menos 50%, y preferiblemente $\geq 80\%$ del intervalo de dosis. Este parámetro se propone para proporcionar una base racional en el diseño de regímenes de dosificación para β -lactámicos (Toutain *et al.*, 2002, McKellar *et al.*, 2004, Papich, M.G., 2014).

Los resultados del análisis PK/PD mediante simulación Monte Carlo en suero muestran que los valores de PTA observados para el esquema posológico propuesto de CFQ (2 mg/kg) por IV y vía IM resultaron ser adecuados frente a las cepas estudiadas de *S. aureus* y *E. coli* con $MIC \leq 0.50 \mu\text{g/mL}$, cuando se utilizó un punto de corte de $T_{>MIC} > 50\%$ (Tabla 28 y Figura 17). Sólo la administración de SC mostró un valor de PTA ligeramente inferior al 90% (Tabla 29). Por otra parte, un $T_{>MIC} > 80\%$ se logró contra patógenos con valores de $MIC \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ para las vías IM y SC, pero no para la administración IV. Finalmente, los valores de PTA fueron $< 90\%$ en todos los casos contra cepas con $MIC = 0,50 \mu\text{g/mL}$.

Las cepas de *S. aureus* y *E. coli* analizadas en este estudio presentaron un valor de CFR (Cumulative Fraction of Response), teniendo en cuenta la distribución total de MIC de la población bacteriana), superior al 90% para $T_{>MIC} > 50\%$ en todas las vías y $T_{>MIC} > 80\%$ para las rutas IM y SC, indicando una buena eficacia antimicrobiana del régimen de dosis propuesto frente a la mayoría de las cepas estudiadas. Sin embargo, los valores de CFR no fueron óptimos tras la administración IV. Hay que tener en cuenta que un punto de corte de $T_{>MIC} = 80\%$ es un criterio exigente, y a menudo se logra una eficacia antimicrobiana adecuada con valores más bajos (Toutain *et al.*, 2002, McKellar *et al.*, 2004, Papich, M.G., 2014). Cabe destacar, además, que la vía intravenosa no se utiliza frecuentemente en este tipo de explotaciones extensivas, siendo las vías IM y/o SC las más utilizadas. Por esto mismo, con un valor de $T_{>MIC}$ de 50% puede ser en muchos casos suficiente, salvo en situaciones determinadas donde el mismo pueda llegar a alcanzar el 80%.

Cuando se evaluaron los puntos de corte de $T_{>MIC}$ en LT, los valores de PTA y CFR del régimen de dosis propuesto de CFQ alcanzaron valores $> 90\%$ en todos los casos y por todas las vías de administración estudiadas. Similares resultados fueron reportados por Shan *et al.* (2014), donde los valores de $T_{>MIC}$ fueron mayores en LT que en suero. Teniendo en cuenta que la mayoría de las infecciones se producen en el líquido extracelular, los resultados del análisis de PK/PD en LT parecerían ser más representativos que el suero, pero teniendo en cuenta que los puntos de corte PK/PD no fueron validados en esta matriz, las conclusiones alcanzadas deben tomarse con cautela. En ausencia de criterios de valoración para $T_{>MIC}$ en el LT, consideramos importante determinarlos, ya que la mayoría de los patógenos se localizan en el líquido extracelular y con menor frecuencia en la sangre (como en la septicemia). Basándose en datos de simulación de Monte Carlo de suero y LT, un intervalo de

dosis de CFQ de 12 h parece lograr una eficacia antimicrobiana óptima administrada por administración IV, IM y SC. Por lo tanto, el régimen de dosis propuesto de CFQ sería una buena opción para el tratamiento antimicrobiano contra las infecciones por *E. coli* y *S. aureus* en llamas.

No obstante consideramos que los datos que aportamos no son representativos de toda la población bacteriana, ya que como indicamos al principio, tan solo se pretendía determinar el valor de MIC para una pequeña cantidad de cepas regionales. Consideramos que es necesario un muestreo mucho mayor y sobre todo con cepas procedentes de diferentes explotaciones y zonas de la provincia de Córdoba y con unas condiciones de explotación mas “reales” que las que se lleva a cabo en el campo de experimentación de esta Universidad.

Si bien en muchos países no esta autorizado el tratamiento profiláctico con antibióticos, dado que la eficacia va en cierta medida relacionada con la carga microbiana o tamaño del inóculo (Fernandez-Olmos *et al.*, 2012), es necesario realizar tratamientos metafilácticos y aplicarlos lo antes posible, como una de las medidas de uso racional de antibióticos, junto con el conocimiento de los puntos de corte de los patógenos de la región o zona geográfica donde tenga lugar la infección y por otro lado poder establecer índices de eficacia en los tejidos diana y no sobre las concentraciones plasmáticas debido a las diferencias en cuanto a distribución y concentraciones alcanzadas en los puntos donde se desarrolla la infección.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. El método microbiológico resultó una técnica válida para la detección y cuantificación de cefquinoma en suero y líquido tisular de llamas, de acuerdo a los criterios de validación de organismos internacionales.
2. Las cajas tisulares en llamas constituyen un método válido para la obtención de líquido tisular y la posterior cuantificación de fármacos en el mismo.
3. Tras la administración de 2 mg/kg por vía intravenosa, intramuscular y subcutánea en llamas adultas, la cefquinoma presentó un comportamiento farmacocinético en llamas diferente al descrito para otras cefalosporinas, caracterizado por un lento aclaramiento corporal total (y consecuentemente un alto tiempo de permanencia en el organismo) y un bajo volumen de distribución. Tras su administración intramuscular y subcutánea la biodisponibilidad absoluta de cefquinoma fue completa, siendo estas vías buenas opciones terapéuticas en esta especie.
4. La cefquinoma presentó un adecuado pasaje y permanencia en el líquido tisular en llamas por todas las vías de administración estudiadas, siendo mayor en las extravasculares. Estos resultados indican que la cefquinoma alcanzaría concentraciones adecuadas en el fluido extracelular de esta especie, y que podría ser una buena opción para el tratamiento de infecciones bacterianas localizadas en el fluido extracelular en llamas.
5. Los datos de MIC₅₀, MIC₉₀, MIC₉₀/MIC₅₀ y la distribución unimodal observada para las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* regionales aisladas de llamas mostraron una adecuada sensibilidad a la cefquinoma, posiblemente debido a un uso menos masivo de antimicrobianos en esta especie. Es importante destacar que el número de cepas aisladas en este estudio es insuficiente para extrapolar estos resultados a la población bacteriana total y será necesario determinar las MIC en un número representativo de cepas, mediante un muestreo de una mayor cantidad de explotaciones de llamas y basado en normas o parámetros o ... para estudios epidemiológicos.
6. Los resultados del análisis farmacocinético/farmacodinámico mediante simulación de Monte Carlo de un régimen posológico de cefquinoma (2 mg/kg cada 12 horas) tras la administración intravenosa, intramuscular y subcutánea en llamas, indican que el mismo presenta una adecuada eficacia para el tratamiento de infecciones causadas por cepas sensibles de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, con valores de MIC ≤ 0.500 µg/ml.
7. Las llamas presentan un comportamiento farmacocinético particular, con similitudes en algunos casos, al observado en otros camélidos, y netamente distinto al de otras especies rumiantes, lo que confirma el riesgo sanitario (bienestar animal, salud pública y medioambiental) y especialmente de incremento de resistencias, al realizar extrapolaciones de regímenes posológicos entre especies.
8. El régimen posológico de cefquinoma propuesto podría ser una buena opción para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por patógenos sensibles en llamas, si bien se requieren estudios clínicos que lo confirmen, dentro del objetivo de promover un uso prudente de ATM en animales.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup, F.M.; Hasman, H.; Veldman, K.; Mevius, D. (2010). Evaluation of eight different cephalosporins for detection of cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist.* 16 (4): 253 - 261.
- Abo-El-Sooud, K., & Goudah, A. (2009). Pharmacokinetics and intramuscular bioavailability of difloxacin in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). *Vet J*, 179(2), 282-286.
- Adam, D., Reichart, B., Beyer, J., Kemkes, B., Rothenfusser, B., Weinhold, C., & Helmerking, M. (1978). Diffusion of cefradine and cefalothin into interstitial fluid of human volunteers with tissue cages. *Infection*, 6(1), S78-S81.
- Alfaro, L. A., Blasco, A. C., Reinoso, J. C., Mestre, M. J. G., & Gascón, A. R. (2004). *Procedimientos en microbiología clínica*.
- Tibary, A., Fite, C., Anouassi, A., Sghiri, A. (2006) Infectious causes of reproductive loss in camelids. *Theriogenology* 66 633-647.
- Aliabadi, S.F. and Lees, P. (2001). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of danofloxacin in serum and tissue fluids of goats following intravenous and intramuscular administration. *Am J Vet Res* 62, 1979–89.
- Aliabadi, F.S. and Lees, P. (2002) Pharmacokinetics and pharmacokinetic/ pharmacodynamic integration of marbofloxacin in calf serum, exudate and transudate. *J Vet Pharmacol Ther*, 25, (3)161-174.
- Aliabadi, F.S., Ali, B.H., Landoni, M.F. and Lees, P. (2003) Pharmacokinetics and PK-PD modeling of danofloxacin in camel serum and tissue cage fluids. *Vet J*, 165, (2)104 118.
- Al-Taher, A. (2010). Pharmacokinetics of cefquinome in camels. *J Anim Vet Adv.* 9 (4): 848 - 852.
- Alzola, R.H., Ghezzi, M.D., Gimeno, E.J., Lupidio, M.C., Castro, A. and Rodríguez, J.A. (2004) Topografía y morfología del estómago de llama (*Lama glama*). *Int J Morph*, 22, (2)155-164.
- Ameghino E, De Martini, J. (1991). Mortalidad de crías de alpacas. *Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA) Univ. San Marcos, Lima, Perú*, pp. 71-80.
- Atef, M.; Ramadan, A.; Afifi, N. A.; Youssef, S. A. (1990). Pharmacokinetic profile of cefotaxime in goats. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 97 (8): 324 - 327.
- Asín-Prieto, E., Rodríguez-Gascón, A. Isla, A., (2015). Applications of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis of antimicrobial agents. *J Inf and Ch* 21, 319-329.
- Aslam, M. A., Ahmed, Z., & Azim, R. (2004). Microbiology and drug sensitivity patterns of chronic suppurative otitis media. *Journal of the College of Physicians and Surgeons, Pakistan: JCPSP*, 14(8), 459-461.

- Araujo, B.V., Diniz, A., Palma, C., Buffé, C., Dalla Costa, T., (2011). PK–PD modeling of blactam antibiotics: In vitro or in vivo models? *J Antib* 64, 439– 446.
- Bartels H, Hilpert P, Barbey K, Betke K, Riegel K, Lang EM, Metcalfe J. (1963). Respiratory functions of blood of the yak, llama, camel, dybowski deer, and african elephant. *Am J Physiol*. 205: 331-336.
- Bauer C, Rollema HS, Till HW, Braunitzer G. (1980). Phosphate binding by llama and camel hemoglobin, *J Comp Physiol*. 136: 67-70.
- Barza, M. (1981) Principles of tissue penetration of antibiotics. *J Anti Chem*, 8, (Suppl. C), 7-28.
- Barza, M.; Lynch, E.; Baum, J. L. (1993). Pharmacokinetics of newer cephalosporins after subconjunctival and intravitreal injection in rabbits. *Arch Ophthalmol*. 111 (1): 121 - 125.
- Banchero, N., R. Grover y J. Will. 1971. Oxygen transport in the llama (*Lama glama*). *Respiration Physiology*. 13:102-115.
- Bennett, J. V.; Brodie, J. L.; Benner, E. J.; Kirby, W. M. M. (1966). Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl Environ Microb*. 14(2): 170 - 77.
- Bergan, T. (1981). Pharmacokinetics of tissue penetration of antibiotics. *Rev Inf Dis* 3, 45-66.
- Bentancor AB, Halperin P, Flores M, Iribarren F. (2009). Antibody response to the epsilon toxin of *Clostridium perfringens* following vaccination of *Lama glama* crias. *J Infect Dev Ctries* 3: 624-627
- Bengtsson, B., Luthman, J. & Jacobsson, S.-O. (1984) Evaluation of a tissue cage model for use in cattle. *Acta Vet Scand*, 25, 480-494.
- Bergogne-Berezin, E., Morel, C., Benard, Y.; Berthelot, G.; Kafe, H. (1978). Pharmacokinetic study of beta-lactam antibiotics in bronchial secretions. *Scand J Infect Dis Suppl*. (14): 267 - 272.
- Bergold, A. M. (2007). Development of a microbiological assay to determine the potency of ceftiofur sodium powder. *J AOAC Int*. 90 (6): 1724 - 1728.
- Bidgood, T.; Papich, M. G. (2002). Plasma pharmacokinetics and tissue fluid concentrations of meropenem after intravenous and subcutaneous administration in dogs. *Am J Vet Res*. 63 (12): 1622 - 1628.
- Block, C. V., Wanner, M., and Heinritzi, K. (2005). Pharmacokinetics of cephalosporine cefquinome in sows at different reproduction-phases. *Tierarztl Umschau*, 60(5), 137-145
- Böttner, A.; Schmid, P.; Humke, R. (1995). In vitro efficacy of cefquinome (INN) and other anti-infective drugs against bovine bacterial isolates from Belgium, France, Germany, The Netherlands, and the United Kingdom. *J Vet Med B*. 42 (6): 377 - 383.
- Brightman, A.H., McLaughlin, S.A., Brumley, V., 1981. Keratoconjunctivitis in allama. *Vet. Med. Small Anim. Clin*. 76 (12), 1776.
- Brown., K. N., Percival, A. (1978). Penetration of antimicrobials into tissue culture cells and leucocytes. *Scand J Infect Dis Suppl*. (14): 251 - 260.

- Brown, M. P.; Gronwall, R. R.; Pattio, N.; Poulos, P. W.; Houston, A. E. (1991). Pharmacokinetics and synovial fluid concentrations of cephapirin in calves with suppurative arthritis. *Am J Vet Res.* 52 (9): 1438 - 1440.
- Brown B.W. (2000). A review on reproduction in South American camelids. *Anim Reprod Sci.* 58: 169-195.
- Burkhardt, J. E., Janovitz, E. B., Bowersock, T. L., & Higgins, R. (1993). Septicemic *Enterococcus* infection in an adult llama. *J Vet Diagn Invest*, 5(1), 106-109.
- Burow, E., Simoneit, C., Tenhagen, B.-A., Kasbohrer, A., 2013. Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli* – a systematic review. *Prev. Vet. Med.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.12.007>.
- Burch, D., Duran, C., and Aarestrup, F. M. 2008. Guidelines for antimicrobial use in swine p. 102–125. In L. Guardabassi, L. Jensen, and H. Kruse (ed.), *Guide to antimicrobial use in animals*. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom.
- Bywater, R.; Silley, P.; Simjee, S. (2006). Antimicrobial breakpoints-definitions and conflicting requirements. *Vet Microbiol.* 118 (1-2): 158 - 159.
- Calnan, J. S., Ford, P. M., Holt, P. J. L., & Pflug, J. J. (1972). Implanted tissue cages—a study in rabbits. *Brit J Plast Surg*, 25, 164-174.
- Canut -Blasco, A., Alfaro, L. A., Reinoso, J. C., Mestre, M. J. G., & Rodríguez-Gascón, A. (2015). Análisis farmacocinético-farmacodinámico en microbiología: herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(1), 48-57.
- Cárceles, C. M., Escudero, E., Fernández-Varón, E., & Marín, P. (2009). Pharmacokinetics after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration of moxifloxacin in sheep. *Vet J*, 180(3), 343-347.
- Cebra CK, Mattson DE, Baker RJ, Sonn RJ, Dearing PL. (2003). Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc.* 223: 1806-1808.
- Campbell, B. G.; Rosin, E. (1998). Effect of food on absorption of cefadroxil and cephalixin in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 21 (5): 418 - 420.
- Catry, B., Haesebrouck, F., Vlieghe, S.D., Feyen, B., Vanrobaeys, M., Opsome, G., Schwarz, S., Kruif, A.D., 2005. Variability in acquired resistance of *Pasteurella* and *Mannheimia* isolates from the nasopharynx of calves, with particular reference to different herd types. *Microb. Drug Resist.* 11, 387–394.
- Cavaco, L.M., Abatih, E., Aarestrup, F.M., Guardabassi, L., (2008). Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3612–3616.
- Chantziaras, I., Boyen, F., Callens, B., Dewulf, J., (2013). Correlation between veterinary antimicrobials use and antimicrobials resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J. Antimicrob. Chemother.*, doi:10.1093/jac/dkt443.

Chisholm, G.D., Waterworth, P.M., Calnan, J.S. & Garrod, L.P. (1973): Concentration of antibacterial agents in interstitial fluid. *Br Med J* 1:569,

Chisholm, G.D., Smith, C.B., Waterworth, P.M. and Calnan, J.S. (1976) Factors influencing the distribution of antibacterial agents in interstitial tissue fluid: molecular size and protein binding. *Infection*, 4 (Suppl. 2), S123-S127.

Christensen, J. M., Smith, B. B., Murdane, S. B., & Hollingshead, N. (1996). The disposition of five therapeutically important antimicrobial agents in llamas. *J Vet Pharmacol Ther*, 19(6), 431-438.

Clarke, C. R. (1989). Tissue-chamber modelling systems applications in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther* 12, 349-68.

CLSI (2008). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; Approved standards- Third edition. CLSI document M31-A3. Wayne, PA: Clinical and laboratory standards institute.

CLSI (2013). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard—Fourth Edition. CLSI Document VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (and Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Second Informational Supplement. CLSI document VET01-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

Constable, P.D., 2004. Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 8–17.

Constable, P.D., Pyorala, S., Smith, G.W., 2008. Antimicrobial use in cattle. In: Guardabassi, L., Jensen, L.B., Kruse, H. (Eds.), *Principles of Prudent and Rational Use of Antimicrobials in Animals*. Blackwell Publishing, Oxford (UK), pp.143–160.

Craig, W. A. (1998). Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis.* 26 (1): 1 - 10.

Crosby AW. (1986). *Ecological Imperialism: The Biological Expansion of Europe, 900-1900*. Cambridge University Press, Cambridge.

Cummings JF, Munnell JL, Vallenias A. 1972. The mucigenous glandular mucosa in the complex stomach of two new-world camelids, the llama and guanaco. *J Morphol* 137: 71–110

Daly, R. C.; Fitzgerald, R. H. Jr., Washington, J. A. (1982). Penetration of cefazolin into normal and osteomyelitic canine cortical bone. *Antimicrob Agents Chemother.* 22 (3): 461 – 469.

DANMAP (2011) – Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria. from food animals, food and humans in Denmark. Available in <http://www.danmap.org/Downloads/media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/Danmap2011.ashx> (cit. 01.10.13).

Davis, B. D.; Dulbecco, R.; Eisen, H. N.; Ginsberg, H. S.; Wood Jr., B. W. (1968). *Principles of Microbiology and Immunology*. Harper & Row, New York

- Davis, J. L.; Salmon, J. H.; Papich, M. G. (2005). Pharmacokinetics and tissue fluid distribution of cephalexin in the horse after oral and i.v. administration. *J Vet Pharmacol Ther.* 28 (5): 425 - 431.
- Deshpande, L.; Pfaller, M. A.; Jones, R. N. (2000). In vitro activity of ceftiofur tested against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* including extended spectrum beta-lactamase producing strains. *Int J Antimicrob Agents.* 15 (4): 271 - 275.
- de Jong, A., Thomas, V., Simjee, S., Moyaert, H., El Garch, F., Maher, K., ... & Rigaut, D. (2014). Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: The VetPath study. *Vet Microb.* 172(1), 202-215.
- Deurenberg, R. H.; Vink, C.; Kalenic, S.; Friedrich, A. W.; Bruggeman, C. A.; Stobberingh, E. E. (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 13 (3): 222 - 235.
- Dinakaran, V., Dumka, V.K., Ranjan, B., Balaje, R., Sidhu, P.K., (2013). Pharmacokinetics following intravenous administration and pharmacodynamics of cefquinome in buffalo calves. *Trop Anim Health Pro* 3, 1–4.
- Ding, H., Li, Y., Chen, Z., Rizwan-ul-Haq, M., Zeng, Z., (2010). Plasma and tissue cage fluid pharmacokinetics of marbofloxacin after intravenous, intramuscular, and oral single-dose application in pigs. *J Vet Pharmacol Ther* 33, 507–510.
- Dolejska, M., Jurcickova, Z., Literak, I., Pokludova, L., Bures, J., Hera, A., Kohoutova, L., Smola, J., Cizek, A., 2011. IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates on a dairy farm. *Vet Microbiol.* 149, 513–516.
- Dova, S.W., San Andrés, M.D.,González, F., San Andrés, M.I., De Lucas, J.J. and Rodríguez, C. (2007) Pharmacokinetic behavior and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin after subcutaneous administration in goats. *Vet J*, 174, (2)425-427.
- Drew, M. L., Johnson, L., Pugh, D., Navarre, C. B., Taylor, I. T., & Craigmill, A. L. (2004). Pharmacokinetics of ceftiofur in llamas and alpacas. *J Vet. Pharmacol Ther*, 27(1), 13-20.
- Drusano, G.L., 2003. The use of Monte-Carlo simulations in antibacterials: sense and non-sense. 12th ISAP cosponsored symposium, 11 May, Glasgow, UK. <http://www.isap.org/2003/ISAP-ECCMID-Glasgow/intro.htm> (accessed 07/15/2015).
- Drusano, G.L., 2004. Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of "bug and drug." *Nat. Rev. Microbiol.* 4,289.
- Drusano, G.L., 2007. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials. *Clinical Infect Disease* 45 (Suppl. 1) S89–S95.
- Dumka, V. K., Dinakaran, V., Ranjan, B., & Rampal, S. (2013). Comparative pharmacokinetics of cefquinome following intravenous and intramuscular administration in goats. *Small Rum Res*, 113(1), 273-277.
- Dowling, P.; Kruth, S. (2006). Antimicrobial therapy of Selected Organ System. In: Giguère, S; Prescott, J; Baggot, J; Walker, R; Dowling, P. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 4th ed. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa, USA. Pp 357 - 379.

Dwan LW, Thompson H, Taylor DJ, Philbey AW. (2008). Laryngeal abscessation due to *Mannheimia haemolytica* in an alpaca (*Vicugna pacos*) cria. Vet Rec. 163: 124-125.

Eickenberg, H. U., Scharfenberger, L., & Waterman, N. G. (1976b). Concentration of antibiotics in renal interstitial fluid, soft tissue interstitial fluid, urine and serum. Infection, 4(2), S97-S104.

Eickenberg, H. U. (1976a). Report on the 1st International Symposium on antibiotic tissue concentration. Ur Res, 4(2), 91-92.

Ehinger, A.M., Schmidt, H., Kietzmann M. (2006). Tissue distribution of cefquinome after intramammary and "systemic" administration in the isolated perfused bovine udder. Vet J. 172, 1, , 147–153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.02.029>

Ellis, J. (1982). The hematology of South American Camelidae and their role in adaptation to altitude. Vet Med Small Anim Clin. Dec. 1796-1802.

El Garch, F., de Jong, A., Simjee, S., Moyaert, H., Klein, U., Ludwig, C., ... & Siegwart, E. (2016). Monitoring of antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe, 2009–2012: VetPath results. Veterinary microbiology, 194, 11-22.

El-Gendy, A.; Tohamy, M.; Abeer, M. Radi. (2009). Pharmacokinetic profile and some pharmacodynamic aspects of cefquinome in chickens. Beni Suef . Vet Med J. 2009. 19 (2): 33 - 37.

El-Sooud, K. A.; El-Banna, H. A.; Hanafy, M. S.; Goudah, A. (2000). Pharmacokinetics and intramuscular bioavailability of cefuroxime sodium in goats. Res Vet Sci. 69 (3): 219 - 224.

El-Hewaity, M. (2014). Influence of Flunixin on the Disposition Kinetic of Cefepime in Goats. Adv Pharm Sci, 2014.

EMA.(1995).Cefquinome.EMA/MRL/005/95.http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500011877.pdf

EMA, (1998). Cefquinome (extension to pigs). Summary report 1. EMA/MRL/405/98-FINAL.http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500011888.pdf

EMA. (1999). Guidelines for the conduct of pharmacokinetic studies in target animal species.EMA/CVMP/133/99-FINAL.http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004355.pdf

EMA.(2000). Guidelines for the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products. EMA/CVMP/016/00 corr-FINAL. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004304.pdf

EMA.(2003). Cefquinome (extension to horses). Summary report 3. EMA/MRL/883/03-FINAL.http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500011892.pdf

EMA. (2008). Reflection paper on the use of 3rd and 4th generation cephalosporins in foodproducing animals in the European Union: development of resistance and impact on

- human and animal health. EMEA/CVMP/SAGAM/81730/06-CONSULTATION. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2009/10/WC500004314.pdf
- EMEA. (2009). Guideline on validation of bioanalytical-methods. EMEA/CHMP/EWP/192217/09.http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/12/WC500018062.pdf
- Engelhardt W, Dycker CH, Lechner-Doll M. (2007). Absorption of short-chain fatty acids, sodium and water from the forestomach of camels. *J Comp Physiol B*. 177: 631-640.
- Errecalde, C.; Prietto, G.; Lüders, C. (2007). Cefalosporinas. En: San Andres M, Boggio JC. *Antimicrobianos y antiparasitarios en medicina veterinaria*. Intermédica. Buenos Aires. Pp. 105 - 117.
- Errecalde, C. A.; Prieto, G. F.; Puellas, I.; Lüders, C. F.; García Ovando, H. (2001). Disposición plasmática de cefquinome en caprinos por administración intramuscular. *InVet*. 3 (1-2): 89 - 94.
- Errecalde, C. A.; Prieto, G. F.; Puellas, I.; Lüders, C. F.; García Ovando, H. (2002). Farmacocinética de cefquinome en terneros por aplicación intramuscular. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*.15 (3): 281 - 285.
- FAO/WHO/OIE. 2007. Report of the Joint FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials. FAO, Rome, Italy.
- Fernández-Baca, S. (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
- Fernandez-Olmos, A. ,Garcia-Castillo, M., Maiz, L.,Lamas, A., Baquero, F.,and Canton, R. (2012). Invitro prevention of *Pseudomona saeruginosa* early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. *Int. J.Antimicrob. Agents* 40, 173–176.[doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.04.006](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.006)
- Fowler, M.E. and Zinkl, J.G. (1989) Reference ranges for hematologic and serum biochemical values in llamas (*Lama glama*). *Am J Vet Res*, 50, (12)2049- 2053.
- Fowler M. 1997. Evolutionary history and differences between camelids and ruminants. *J Camel Pract Res*. 4: 99-105.
- Fowler M. 1998. *Medicine and surgery of South American Camelids*. Llama, Alpaca, Vicuña, Guanaco. Ames, Iowa State University Press. Iowa. 391 p.
- Fowler M. (2008). Camelids are not ruminants. En *Zoo and Wild Animal Medicine*. Saunders. St. Louis. Missouri.
- Fowler, Murray E. (2010). *Medicine and surgery of camelids*. - 3rd ed. 2010 ISBN-13:978-0-8138-0616-7.Iowa 50014-8300, USA
- Frank, N., Couetil, L.L., Clarke, K.A., (1998). *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* septicemia and meningoencephalitis in a 7-day-old llama. *Can.Vet. J*. 39, 100–102.

Frank, L. A.; Kunkle, G. A. (1993). Comparison of the efficacy of cefadroxil and generic and proprietary cephalexin in the treatment of pyoderma in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 203 (4): 530 - 533.

Fung-Tomc, J. C. (1997). Fourth-Generation Cephalosporins. *Clin Microbiol Newsl.* 19 (17): 129 -136.

Ganière, J. P.; Medaille, C.; Mangion, C. (2005). Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyoderma. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 52 (1): 25 - 31.

Garcia-Migura, L., Hendriksen, R. S., Fraile, L., & Aarestrup, F. M. (2014). Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Vet microb.* 170(1), 1-9.

Garry, F., Weiser, M.G. and Belknap, E. (1994) Clinical pathology of llamas. *Vet Clin N Am-Food A*, 10, (2)201-209.

Garry, F. (1989) Clinical pathology of llamas. *Vet Clin N Am-Food A*, 5,(1)55-70.

Ghezzi, M.D., Alzola, R.H., Lupidio, M.C., Massone, A., Castro, A.N. and Rodríguez, J.A. (2000) Conducto hepatopancreático de la llama (*Lama glama*). *Revista Chilena de Anatomía*, 18, (1).

Gilmour NJL, Gilmour JS. (1989). Pasteurellosis of sheep, p. 223-261. En: *Pasteurella and Pasteurellosis*. Academic Press, London, UK.

Giussani DA, Riquelme RA, Sanhueza EM, Hanson MA, Blanco CE, Llanos AJ. (1999). Adrenergic and vasopressinergic contributions to the cardiovascular response to acute hypoxaemia in the llama fetus. *J Physiol.* 515 (Pt 1): 233-241.

Guardabassi, L., & Prescott, J. F. (2015). Antimicrobial stewardship in small animal veterinary practice: from theory to practice. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Pract*, 45(2), 361-376.

Goudah, A. (2008). Pharmacokinetic parameters of ceftriaxone after single intravenous and intramuscular administration in camels (*Camelus Dromedarius*). *Res Vet Sci*, 84(3), 483-489.

Goudah, A., Shin, H. C., Kim, J. S., Chang, B. J., Shim, J. H., & Abd el Atty, A. M. (2009). Evaluation of single dose pharmacokinetics of cefepime in healthy bull camels (*Camelus dromedaries*). *J Vet Pharmacol Ther*, 32(4), 393-396.

Guerra, F. L.; Paim, C. S.; Steppe, M.; Schapoval, E. E. (2005). Biological assay and liquid chromatographic method for analysis of moxifloxacin in tablets. *J AOAC Int.* 88 (4): 1086 - 1092.

Guglick, M.A., MacAllister, C.G., Clarke, C.R., Pollet, R., Hague, C. & Clarke, J.M. (1998) Pharmacokinetics of cefepime and comparison with those of ceftiofur in horses. *Am J Vet Res*, 59, 458-463.

Guyton, A.C. (1963): A concept of negative interstitial pressure based on pressures in implanted perforated capsules. *Circ Res* 12:399,

Guyton, A.C., Granger, H.J. & Taylor, A.E. (1971) Interstitial fluid pressure. *Physiol Rev*, 51, 527-563.

Guyton, A.C. (1981) *Textbook of Medical Physiology*, 6th edn. W. B. Saunders Co., Philadelphia

Greko, C., Finn, M., Öhagen, P., Franklin, A., & Bengtsson, B. (2003). A tissue cage model in calves for studies on pharmacokinetic/pharmacodynamic interactions of antimicrobials. *Int J Antimicrob agents*, 22(4), 429-438.

Greko, C., Bengtsson, B., Franklin, A., Jacobsson, S. O., Wiese, B., & Luthman, J. (2002). Efficacy of trimethoprim-sulfadoxine against *Escherichia coli* in a tissue cage model in calves. *J Vet Pharmacol Ther*, 25(6), 413-423.

Haljamae, J., Linde, A. & Amundson, B. (1974) Comparative analyses of capsular fluid and interstitial fluid. *Am J Physiol*, 227, 1199--1205

Harris P, Heath D, Smith P, Williams DR, Ramirez A, Kruger H, Jones DM. (1982). Pulmonary circulation of the llama at high and low altitudes. *Thorax* 37: 38-45.

Harrison JA. (1985). Giant camels from the Cenozoic of North America. *Smithsonian Contributions to Paleobiology*. 5-7: 1-29.

Harron, D.W.G., Nation, G., Tinson, A.H., Dhanasekharan, S. and Sheen, R. (1997) Effects of administration routes and dose on the pharmacokinetics of enrofloxacin in young and mature camels. *J Vet Pharmacol Ther*, 20, (suppl 1)54-55.

Hauschke, D., Steinijans, V., & Pigeot, I. (2007). *Bioequivalence studies in drug development: methods and applications* (Vol. 60). John Wiley & sons.

Hawkey, C.M. and Gulland, F.M. (1988) Haematology of clinically normal and abnormal captive llamas and guanaco. *Vet Rec*, 122, (10)232-234.

Helke, K. L., McCrackin, M. A., Galloway, A. M., Poole, A. Z., Salgado, C. D., & Marriott, B. P. (2017). Effects of antimicrobial use in agricultural animals on drug-resistant foodborne salmonellosis in humans: A systematic literature review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(3), 472-488.

Herrera EA, Reyes RV, Giussani DA, Riquelme RA, Sanhueza EM, Ebensperger G, Casanello P, Méndez N, Ebensperger R, Sepúlveda-Kattan E, Pulgar VM, Cabello G, Blanco CE, Hanson MA, Parer JT, Llanos AJ. (2008). Carbon monoxide: a novel pulmonary artery vasodilator in neonatal llamas of the Andean altiplano. *Cardiovasc Res*. 77: 197-201.

Higgins, P. G.; Coleman, K.; Amyes, S. G. (2000). Bactericidal and bacteriostatic activity of gemifloxacin against *Acinetobacter* spp in vitro. *J Antimicrob Chemother*. 45 (Suppl 1): 71 - 77.

Hornish, R. E.; Kotarski, S. F. (2002). Cephalosporins in veterinary medicine - ceftiofur use in food animals. *Curr Top Med Chem*. 2 (7): 717 - 731.

Hung AL, Alvarado A, Lopez T, Perales R, Li O, Garcia E. (1991). Detection of antibodies to mycoplasmas in South American camelids. *Res Vet Sci*. 51:250-253.

- Hwang, Y.H., Song, I.B., Lee, H.K., Kim, T.W., Kim, M.S., Lim, J.H., Park, B.K., Yun, H.I., (2011). Pharmacokinetics and bioavailability of cefquinome in rabbits following intravenous and intramuscular administration. *J Vet Pharmacol Ther* 2, 618–620.
- Ismail, M. M. (2005). Pharmacokinetics, urinary and mammary excretion of ceftriaxone in lactating goats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 52 (7): 354 - 358.
- Jacoby, G. A.; Munoz-Price, L. S. (2005). The new beta-lactamases. *N Engl J Med*. 352 (4): 380 -391.
- Jones, R. N. (1989). A review of cephalosporin metabolism: a lesson to be learned for future chemotherapy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 12 (1): 25 - 31.
- Joshi, B., & Sharma, S. K. (2007). Pharmacokinetic disposition and bioavailability of cefepime in buffalo calves. *J Vet Pharmacol Ther*, 30(5), 500-502.
- Kamili, A., Bengoumi, M., Oukessou, M., Faye, B., & Lefebvre, H. P. (2013). Assessment of glomerular filtration rate in normally hydrated and dehydrated dromedary camel by plasma exogenous creatinine clearance test. *Em J of F and Agricult*, 25(4), 314.
- Kasiakou, S. K.; Lawrence, K. R.; Choulis, N.; Falagas, M. E. (2005). Continuous versus intermittent intravenous administration of antibacterials with time-dependent action: a systematic review of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Drugs*. 65 (17): 2499 - 2511.
- Katsuda, K.; Kohmoto, M.; Mikami, O.; Tamamura, Y.; Uchida, I. (2012). Plasmid-mediated florfenicol resistance in *Mannheimia haemolytica* isolated from cattle. *Vet Microbiol*. 155 (2-4): 444 - 447.
- Kinabo, L. D.; McKellar, Q. A. (1989). Current models in pharmacokinetics: applications in veterinary pharmacology. *Vet Res Commun*. 13 (2): 141 - 157.
- Kitamura, Y., Yoshida, K., Kusama, M., & Sugiyama, Y. (2014). A proposal of a pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) index map for selecting an optimal PK/PD index from conventional indices (AUC/MIC, C_{max}/MIC, and TAM) for antibiotics. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 29(6), 455-462.
- Kleinschmidt T, März J, Jürgens KD, Braunitzer G. (1986). Interaction of allosteric effectors with betaglobin chains and high altitude respiration in mammals. The primary structure of two tylopod hemoglobins with high oxygen affinity: vicuna (*Lama vicugna*) and alpaca (*Lama pacos*) *Biol Chem. H-S* 367: 153-160.
- Kollef, M. H. (2009). New antimicrobial agents for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Crit Care Resusc*. 11 (4): 282 - 286.
- Kreil, V., Otero, P., Ambros, I., Waxman-Dova, S., Montoya, L., Albarellos, G., Rebuelto, M. and Hallu, R. (2001) Pharmacokinetics of enrofloxacin in llamas (*Lama glama*). *Investigación Veterinaria*, 3, (1)55-61.
- Kreil, V. E., Ambros, L., Montoya, L., Hallu, R., Rebuelto, M., and Bramuglia, G. (2012). Pharmacokinetics of sodium and trihydrate amoxicillin after intravenous and intramuscular administration in llamas (*Lama glama*). *Small Rum Res*, 102(2), 208-212.

- Lavy, E.; Shem-Tov, M.; Or-Bach, A.; Ziv, G.; Glickman, A.; Saran, A. (1997). Oral availability and bioequivalence studies in dogs of two cephalexin tablets and a cephalexin capsule. *J Vet Pharmacol Ther.* 20 (Suppl 1): 63 - 64.
- Lang, I., Rose, M., Thomas, E. & Zschiesche, E. (2002) A field study of cefquinome for the treatment of pigs with respiratory disease. *Rev Med Vet-Toulouse*, 153, 575–580.
- Lassen, E.D., Pearson, E.G., Long, P., Schmotzer, W.B., Kaneps, A.J. and Riebold, T.W. (1986) Clinical biochemical values of llamas: reference values. *Am J Vet Res*, 47, (10)2278-2280.
- Lechner-Doll M, von Engelhardt W, Abbas HM, Mousa L, Luciano L, Reale E. (1995). Particularities in forestomach anatomy, physiology and biochemistry of camelids compared to ruminants. In: Tisserand JL (ed) *Elevage et alimentation du dromadaire-camel production and nutrition. Options méditerranéennes, Serie B: Etudes et Recherches* Nr 13, CIHEAM, Paris, pp 19-32.
- Li, X. Z.; Mehrotra, M.; Ghimire, S.; Adewoye, L. (2007). Beta-Lactam resistance and betalactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol.* 121 (3-4): 197 - 214.
- Li, X.B., Wu, W.X., Su, D., Wang, Z.J., Jiang, H.Y. & Shen, J.Z. (2008) Pharmacokinetics and bioavailability of cefquinome in healthy piglets. *J Vet Pharmacol Ther*, 31, 523–527.
- Liu, B., Zhang, C., Zhang, X., Yang, S., Yu, J., Sun, J. & Liu, Y. (2012) Pharmacokinetics and bioavailability of cefquinome in crossbred wild boars. *J Vet Pharmacol Ther*, 35, 611–614.
- Limbert, M.; Isert, D.; Klesel, N.; Markus, A.; Seeger, K.; Seibert, G; Schrinner, E. (1991). Antibacterial activities in vitro and in vivo and pharmacokinetics of cefquinome (HR 111V), a new broad-spectrum cephalosporin. *Antimicrob Agents Chemother.* 35 (1): 14 - 19.
- Litterio, Nicolás Javier. (2012). Estudio farmacocinético-farmacodinámico de la cefquinoma en cabras en función de la edad, la gestación y la lactancia. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de veterinaria, Departamento de Toxicología y Farmacología. Madrid
- Llanos AJ, Riquelme RA, Herrera EA, Ebensperger G, Krause B, Reyes RV, Sanhueza EM, Pulgar VM, Behn C, Cabello G, Parer JT, Giussani DA, Blanco CE, Hanson MA. (2007). Evolving in thin air-lessons from the llama fetus in the altiplano. *Respir Physiol Neurobiol.* 158: 298-306.
- Llanos AJ, Riquelme RA, Sanhueza EM, Hanson MA, Blanco CE, Parer JT, Herrera EA, Pulgar VM, Reyes RV, Cabello G, Giussani DA.(2003). The fetal llama versus the fetal sheep: different strategies to withstand hypoxia. *High Alt Med Biol.* 4: 193-202.
- Lorenzutti A.M. Farmacocinética de marbofloxacin en cabras: análisis microbiológico versus cromatográfico. Proyecto de investigación, para optar a la obtención del DEA. (2009). Departamento de Toxicología y Farmacología. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Lohr, B.; Brunner, B.; Hellmann, K. (2004). Survey about the use of Cobactan®-Suspension 2.5% in animals with relevance for the veterinary practice: cattle. *Tierärztl Umschau*. 59 (6): 352 - 355.

Lu, G. F., Yang, H. F., Li, Y. J., & JIANG, C. M. (2007). Pharmacokinetics of cefquinome sulfate suspension in pigs. *Journal-Yangzhou University Agricultural and life sciences edition*, 28(4), 18.

Luciano L, Reale E, Engelhardt W. 1980. The fine structure of the stomach mucosa of the llama. The fundic region of the hind stomach. *Cell Tissue. Res*. 208: 207-228.

MacGowan, A. P.; Wise, R. (2001). Establishing MIC breakpoints and the interpretation of in vitro susceptibility tests. *J Antimicrob Chemother*. 48 (Suppl 1): 17 - 28.

Maden, M., Traş, B., Baş, A. L., Elmas, M., Yazar, E., & Birdane, F. M. (2001). Pharmacology: Investigation of biochemical and haematological side-effects of cefquinome in healthy dogs. *Vet Quart*, 23(1), 32-34.

Mangal M, Sharma SK. Effect of repeated administration of cefquinome on biochemical and hematological parameters in buffalo calves (2015). *Toxicol Int*. 22:110-3. <http://www.toxicologyinternational.com/text.asp?2015/22/1/110/172267>

McKellar, Q. A.; Sanchez Bruni, S. F.; Jones, D. G. (2004). Pharmacokinetic / pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther*. 27 (6): 503 - 514.

Mella, S. M.; Zemelman, C. M.; Bello, H. T.; Dominguez, M. Y.; Gonzalez, G. R.; Zemelman, R. Z. (2001). Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de 4ª generación. *Rev Chil Infectol*. 18 (1): 7 - 19.

Melnikow, E.; Schoenfeld, C.; Spehr, V.; Warrass, R.; Gunkel, N.; Duszenko, M.; Selzer, P. M.; Ullrich, H. J. (2008). A compendium of antibiotic-induced transcription profiles reveals broad regulation of *Pasteurella multocida* virulence genes. *Vet Microbiol*. 131 (3-4): 277 - 292.

Mengoni GL. (2008). Camelids in ancient Andean societies: a review of the zooarchaeological evidence. *Quatern Int*. 185: 59-68.

Mercado EC, Rodríguez SM, Elizondo AM, Marcoppido G, Parreño V. (2004). Isolation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from a South American camelid (*Lama guanicoe*) with diarrhea. *J Clin Microbiol*. 42:4809-4811

Mendez, A. S.; Weisheimer, V.; Oppe, T. P.; Steppe, M.; Schapoval, E. E. (2005). Microbiological assay for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. *J Pharm Biomed Anal*. 37 (4): 649 - 653.

Meyer, S.; Giguère, S.; Rodriguez, R.; Zielinski, R. J.; Grover, G. S.; Brown, S. A. (2009). Pharmacokinetics of intravenous ceftiofur sodium and concentration in body fluids of foals. *J Vet Pharmacol Ther*. 32 (4): 309 - 316.

- Michael, G. B., Freitag, C., Wendlandt, S., Eidam, C., Feßler, A. T., Lopes, G. V., & Schwarz, S. (2015). Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. *Future microb*, 10(3), 427-443.
- Moraga F, Monge C, Riquelme R, Llanos AJ. (1996). Fetal and maternal blood oxygen affinity: a comparative study in llamas and sheep. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 115:111-115.
- Mulrooney, D.M., Johnson, M.R., Smith, B.B. and Zimmerman, G.L. (1989) Clinical reference values for serum protein electrophoresis for the llama (*Lama glama*). *Am J Vet Res*, 50, (11)1889-1892.
- Nedbalcova, K., Nechvatalova, K., Pokludova, L., Bures, J., Kucerova, Z., Koutecka, L., & Hera, A. (2014). Resistance to selected beta-lactam antibiotics. *Vet Microb*, 171(3), 328-336.
- Nicola, F., & Casellas, J. M. (2012). ¿Cómo predecir el éxito o fracaso del tratamiento antibiótico?: Qué es y para qué sirve la Farmacocinética-Farmacodinamia. *La Gaceta de Infectología y Microbiología Clínica Latinoamericana*, 2(2).
- Odenholt, I. (2001). Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Int J Antimicrob Agents*. 17 (1): 1 - 8.
- Palanivel, K. M.; Selvasubramanian, S.; Nedunchelliyan, S. (2005). Treatment of clinical mastitis with cefquinome. *Indian Vet J*. 82 (12): 1313 - 1314.
- Parlevliet, J.; Lynn, J.; Paccamonti, D. (2006). The use of cefquinome in equine semen extender. *Anim Reprod Sci*. 94: 121 - 124.
- Parlevliet, J. M., Paccamonti, D. L., & Barker, S. A. (2009). Cefquinome Concentrations in Endometrium after Intrauterine Treatment of Cobactan 4.5%® in Mares and Inflammatory Response of the Endometrium to this Treatment. *Reprod Dom Anim*, 44(2), 189-193.
- Patani, K., Patel, U., Bhavsar, S., Thaker, A., & Sarvaiya, J. (2008). Single dose pharmacokinetics of cefepime after intravenous and intramuscular administration in goats. *Turk J Vet and Anim Sci*, 32(3), 159.
- Patel, P. N., Patel, U. D., Bhavsar, S. K., & Thaker, A. M. (2010). Pharmacokinetics of cefepime following intravenous and intramuscular administration in sheep. *Iran J Pharm Therap*, 9(1), 7-10.
- Papich, M.; Riviere, J. (2009). Beta-lactam antibiotics: penicillins, cephalosporins, and related drugs. In: Riviere, J. and Papich, M. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 9th ed. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa, USA. Pp: 865 - 893.
- Papich, M.G. (2014). Pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling and the rational selection of dosage regimes for the prudent use of antimicrobial drugs. *Vet Microbiol* 171,480–486.doi:10.1016/j.vetmic.2013.12.021
- Pelligand, L., House, A.K., Summers, B.A., Hatzis, A., Tivers, M., Elliott, J., Lees, P., (2011). Development and validation of a tissue cage model of acute inflammation in the cat. *J Vet Pharmacol Ther* 4, 1–10.

Picco, E.; Stiefel, S.; Cerra, M.; Michel, A.; Rubio, M.; Formentini, E. (2009). Antibacterianos: certezas e hipótesis acerca de la relación farmacocinética-farmacodinámica (PK-PD) de los mismos. *Panorama Actual Med.* 33 (327): 994 - 1007.

Pinto Jiménez, Chris E.; M. Espada, C. Cid Vázquez M.D. (2010). CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS: CLASIFICACIÓN, ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 4(1):2336.

Popick, A. C.; Crouthamel, W. G.; Bekersky, I. (1987). Plasma protein binding of ceftriaxone. *Xenobiotica.* 17 (10): 1139 - 1145.

Prawez, S.; Raina, R.; Dimitrova, D.; Pankaj, N. K.; Ahanger, A. A.; Verma, P.K. (2010). The pharmacokinetics of cefepime in goats following single-dose i.v. and i.m. administration. *Turk J Vet Anim Sci* 34 (5): 427 - 431.

Prescott, J. (2006). Beta-lactam antibiotics: cephalosporins. In: Giguère, S; Prescott, J; Baggot, J; Walker, R; Dowling, P. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.* 4th ed. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa, USA. Pp 139 - 158.

Prescott, J. F., & Dowling, P. M. (Eds.). (2013). *Antimicrobial therapy in veterinary medicine.* John Wiley & Sons.

Raggi L.A. (2005). Situación actual de los camélidos Sudamericanos en Chile. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina. TCP/RLA/2914. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).

Rani, S., & Pargal, A. (2004). Bioequivalence: An overview of statistical concepts. *Ind J Pharm*, Vol. 36, No. 4, August, 2004, pp. 209-216

Ramírez IA, Huaman D. (1981). Evaluación de la enterotoxemia en crías de alpacas vacunadas. En: Libro de resúmenes. IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Punta Arena, Chile. Pag:31-32.

Ramírez A, Ellis R, Sumar J, Leyva V. (1985). E. coli enteropatógena en alpacas neonatales: aislamiento de intestino delgado y su inoculación oral. En: Libro de resúmenes. V Convención Internacional sobre Camelidos Sudamericanos. Cusco, Perú. p 34.

Ramírez, A. (1991). Enfermedades infecciosas en alpacas y llamas. Producción de rumiantes menores: alpacas, 201-247.

Rani, A. Pargal S. (2004). Bioequivalence: An overview of statistical concepts. *Indian J Pharmacol* Vol 36 - 4 209-216

Reynafarje, C., Faura, J., Villavicencio, D., Curaca, A., Reynafarje, B., Oyola, L., Contreras, L., Vallenar, E. y Faura, A. 1975. Oxygen transport of hemoglobin in high-altitude animals (Camelidae). *J App Physiol.* 38(5): 806-810.

Rice JA, Carrasco-Medina L, Hodgins DC, Shewen PE. (2008). Mannheimia haemolytica in a bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev.* 8: 117-128.

- Riviere, J. (2009). Pharmacokinetic. In: Riviere, J. and Papich, M. Veterinary pharmacology and therapeutics. 9th ed. Wiley Blackwell. Ames, Iowa, USA. Pp 1524
- Riviere, J. (2011). Noncompartmental models. In: Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques and Applications. Wiley Blackwell. Ames, Iowa, USA. Pp 456.
- Rosadio, R. H., and Ameghino, E. F. (1994). Coccidial infections in neonatal Peruvian alpacas. *Vet Rec*, 135(19), 459-460.
- Rosadio, R., Maturrano, L., Pérez, D., Llanco, L., Castillo, H., Veliz, A., and Londoño, P. (2008). Enterotoxemia: new evidence on pathogenesis and prevention of the number one cause of neonatal alpaca mortality in South America. In *Proc World Alpaca Conference*. Sydney, Australia. p (pp. 50-55).
- Rosin, E.; Uphoff, T. S.; Schultz-Darken, N. J.; Collins, M. T. (1993). Cefazolin antibacterial activity and concentrations in serum and the surgical wound in dogs. *Am J Vet Res*. 54 (8): 1317 - 1321.
- Rubio-Langre, S., De Lucas, J. J., Litterio, N. J., Aguilar, S., Boggio, J. C., & San Andrés, M. I. (2012). Pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous, subcutaneous and intramuscular administrations in llamas (*Lama glama*). *Small rum res*, 106(1), 64-69.
- Rule R., Rubio M., Perelli M.C. (1991). Pharmacokinetics of ceftazidime in sheep and its penetration into tissue and peritoneal fluids. *Res Vet Sci*; 51:233-238.
- Rule, R., Vita, M., & Martino, P. (2010). Kinetics and Penetration into Inflammatory Tissue Cage Fluid of Cefepime Administered to Rabbits. *Scand J Lab Anim Sci*, 37(1), 23-26.
- Ryan, D.M. (1978) Implanted tissue-cages: a critical evaluation of their relevance in measuring tissue concentrations of antibiotics. *Scan J Inf Dis*, Suppl. 13, 58--62.
- Sabia, C., Stefani, S., Messi, P., de Niederhäusern, S., Bondi, M., Condò, C., & Anacarso, I. (2017). Extended-Spectrum B-Lactamase and Plasmid-Mediated AMPC Genes in Swine and Ground Pork. *J Food Safety*, 37(1).
- San Andrés M. D.; de Lucas J. (2007). Paso de los antimicrobianos a través de las barreras biológicas. En: San Andres M.; Boggio, J. C. Antimicrobianos y antiparasitarios en medicina veterinaria. Intermédica. Buenos Aires. Pp. 33 - 54.
- San Martin, F., Bryant, F.C., (1989). Nutrition of domesticated South American llamas and alpacas. *Small Ruminant Res*. 2: 191-216.
- Shalaby, M. A., Goudah, A., Gihan, M. K., & Hassan, A. S. (2014). Disposition kinetics of cefquinome in healthy rabbits following intramuscular and oral administration. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 4, Issue 01, 2015
- Sidhu, P. K., Landoni, M. F., Aliabadi, F. S., & Lees, P. (2010). PK–PD integration and modeling of marbofloxacin in sheep. *Res Vet Sci*, 88(1), 134-141.
- Shan Q, Yang F, Wang J, Ding H, He L, Zeng Z. (2014). Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship of cefquinome against *Pasteurella multocida* in a tissue-cage model in yellowcattle. *J Vet Pharmacol Ther*;37:178-85.

- Sharpe MS, Lord LK, Wittum TE, Anderson DE. (2009). Pre-weaning morbidity and mortality of llamas and alpacas. *Aust Vet J.* 87: 56-60.
- Sheldon, I. M.; Bushnell, M.; Montgomery, J.; Rycroft, A. N. (2004). Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle. *Vet Rec.* 155 (13): 383 - 387.
- Singh, R.; Saxena, A.; Singh, H. (2009). Identification of group specific motifs in beta-lactamase family of proteins. *J Biomed Sci.* 16 (1): 109.
- Schmidt, C. A.; Agarrayua, D. A.; Laporta, L. V.; Machado, J. C.; Manfio, M. L.; Bittencourt, C. F. (2009). Development and validation of a microbiological agar assay for determination of cefuroxime sodium in pharmaceutical preparations. *J Microbiol Methods.* 77 (3): 308 - 315.
- Sellyei, B.; Varga, Z.; Szentesi-Samu, K.; Kaszanyitzky, E.; Magyar, T. (2009). Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from swine and poultry. *Acta Vet Hung.* 57 (3): 357 - 367.
- Selvi Sabater, P. (2015). Estudio farmacocinético y excreción en leche de cefquinome en ovino. Proyecto de investigación: 11850/PI/09. Facultad de veterinaria. Universidad de Murcia.
- Semalulu, S. S., & Chirino-Trejo, M. (1991). *Streptococcus sanguis* Type-1 Associated with Abortion in a Llama (*Lama glama*). *J Zoo Wildlife Med*, 351-354.
- Smiet, E.; Haritova, A.; Heil, B. A.; Fink-Gremmels, J.; Wijnberg, I. D. (2012). Comparing the pharmacokinetics of a fourth generation cephalosporin in three different age groups of New Forest ponies. *Equine Vet J.* 44 Suppl. (41): 52 - 56.
- Smith, M.; Sherman, D. (2009). *Goat medicine*. 2nd ed. Wiley - Blackwell. Iowa USA. Pp. 871.
- Prescott, J. F., & Dowling, P. M. (Eds.). (2013). *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. John Wiley & Sons. 5th edition.
- Sponheimer M, Robinson T, Roeder B, Hammer J, Ayliffe L, Passey B, Cerling T, Dearing D, Ehleringer J. (2003). Digestion and passage rates of grass hays by llamas, alpacas, goats, rabbits, and horses. *Small Ruminant Res.* 48:149
- Stegemann, M. R.; Sherington, J.; Blanchflower, S. (2006a). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cefovecin in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 29 (6): 501 - 511.
- Stegemann, M. R.; Sherington, J.; Coati, N.; Brown, S. A.; Blanchflower, S. (2006b). Pharmacokinetics of cefovecin in cats. *J Vet Pharmacol Ther.* 29 (6): 513 - 524.
- Soback, S.; Ziv, G.; Bor, A.; Shapira, M. (1988). Pharmacokinetics of cephalixin glycinate in lactating cows and ewes. *J Vet Med. A.* 35 (10): 755 - 760.
- Souza, M. J.; Kulmann, R. R.; Silva, L. M.; Nogueira, D. R.; Zimmermann, E. S.; Schmidt, C. A. (2006). Development and in-house validation of a microbiological assay for determination of cefepime in injectable preparations. *J AOAC Int.* 89 (5): 1367 - 1372.

- Stannarius, C.; Bürgi, E.; Regula, G.; Zychowska, M. A.; Zweifel, C.; Stephan, R. (2009). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from Swiss weaned pigs and sows. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 151 (3): 119 - 125.
- Stanley HF, Kadwell M, Wheeler JC. (1994). Molecular evolution of the family Camelidae: a mitochondrial DNA study. *Proc R Soc Lond. B.* 256:1-6.
- SVARM (2013) – Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. Available in <https://www.jordbruksverket.se/download/18.5ce6c400139a12671c880005510/Svarm2011.pdf> (cit. 01.10.13).
- Thedford TR, Johnson LW (1989). Infectious diseases of New-World camelids (NWC). *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 5: 145-157.
- Thomas, E.; Roy, O.; Skowronski, V.; Zschiesche, E.; Martin, G.; Böttner, A. (2004). Comparative field efficacy study between cefquinome and gentamicin in neonatal calves with clinical signs of septicemia. *Rev Med Vet-Toulouse* 155 (10): 489 - 493.
- Thomas, E.; Thomas, V.; Wilhelm, C. (2006). Antibacterial activity of cefquinome against equine bacterial pathogens. *Vet Microbiol.* 115 (1-3): 140 - 147.
- Tibary A, Fite C, Anouassi A, Sghiri A. 2006. Infectious causes of reproductive loss in camelids. *Theriogenology* 66: 633-647.
- Tight, R.R., Prior, R.B., Perkins, R.L. & Rotilie, C.A. (1975) Fluid and penicillin G dynamics in polyethylene chambers implanted subcutaneously in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother*, 8, 495-497.
- Tohamy, M. A. (2011). Age-related intramuscular pharmacokinetics of cefquinome in sheep. *Small Rumin Res.* 99 (1): 72 - 76.
- Toutain, P. L.; del Castillo J. R.; Bousquet-Mélou, A. (2002). The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Res Vet Sci.* 73 (2): 105 - 114.
- Toutain, P.L.; Bousquet-Mélou, A. (2004b). Plasma clearance. *J Vet Pharmacol Ther.* 27 (6): 415 - 425.
- Toutain, P.L.; Bousquet-Mélou, A. (2004c). Plasma terminal half-life. *J Vet Pharmacol Ther.* 27 (6): 427 - 439.
- Toutain, P.L.; Bousquet-Mélou, A. (2004d). Volumes of distribution. *J Vet Pharmacol Ther.* 27 (6): 441 - 453.
- Tornquist, S.J. (2009) Clinical pathology of llamas and alpacas. *Vet Clin N Am-Food* , 25, (2)311-322.
- Tozer, T.; Rowland, M. (2006). Introduction to pharmacokinetics and pharmacodynamics: The quantitative basis of drug therapy. Lippincott Williams and Wilkins. London. Pp. 326.
- Turnidge, J.D., 1998. The pharmacodynamics of β -lactams. *Clin Inf Diseases* 27, 10–22.
- Uney, K., Altan, F., Elmas, M., (2011). Development and validation of a highperformance liquid chromatography method for determination of cefquinoma concentrations in sheep

plasma and its application to pharmacokinetic studies. *Ant Agents Chemotherapy*. 2, 854–859.

Ungemach, F.R., Müller-Bahrddt, D., Abraham, G., (2006). Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microb.* 296, 33–38.

Vallenas A, Cummings JF, Munnell JF. (1971). A gross study of the compartmentalized stomach of two new-world camelids, the llama and guanaco. *J Morphol.* 134: 399-423.

VICH (1998a). Guidelines on Good Clinical Practice (GCP). Topic GL 9. CVMP/VICH/595/98-FINAL.

VICH (1998b). Validation of analytical procedures: Methodology. GL 2/ 1998.

VICH (2008). Target animal safety for veterinary pharmaceutical products. GL 43/2008.

Voermans, M., Van Soest, J. M., Van Duijkeren, E., & Ensink, J. M. (2006). Clinical efficacy of intravenous administration of marbofloxacin in a *Staphylococcus aureus* infection in tissue cages in ponies. *J Vet Pharmacol Ther*, 29(6), 555-560.

Wackowicz, G.; Richard, J. J.; Fabreguettes, G (1997). Pharmacokinetics of cefalexin in plasma and urine after single intravenous and oral (tablets) administration in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 20 (Suppl 1): 63 - 64.

Waite LH, Cebra CK, Firshman AM, McKenzie EC, Schlipf JW Jr. (2008). Cryptosporidiosis in 20 alpaca crias. *J Am Vet Med Assoc.* 233: 294-298.

Walker, R. D., Stein, G. E., Hauptman, J. G., MacDonald, K. H., Budsberg, S. C., & Rosser Jr, E. J. (1990). Serum and tissue cage fluid concentrations of ciprofloxacin after oral administration of the drug to healthy dogs. *Am J Vet Res*, 51(6), 896-900.

Wallmann, J.; Schröter, K.; Wieler, L. H.; Kroker, R. (2003). National antibiotic resistance monitoring in veterinary pathogens from sick food-producing animals: the German programme and results from the 2001 pilot study. *Int J Antimicrob Agents.* 22 (4): 420 - 428.

Waterman, N.G., Raff, M.J., Scharfenberger, L. and Barnwell, P.A. (1976) Protein binding and concentrations of cephaloridine and cefazolin in serum and interstitial fluid of dogs. *Inf Dis*, 133, 642--647.

Wang, J.A. Shan, Q. Ding, H. , Liang G. Zenga Z. (2014). Pharmacodynamics of Cefquinome in a Neutropenic Mouse Thigh Model of *Staphylococcus aureus* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* p. 3008 –3012 June 2014 Volume 58 Number 6.

Waterman, N. G.; Scharfenberger, L. F. (1978). Concentration relationships of cefaclor in serum, interstitial fluid, bile and urine of dogs. *Antimicrob Agents Chemother.* 14 (4): 614 - 616.

Webb SD. (1974). Pleistocene mammals of Florida, Gainesville, University of Florida Press, 170-259.

Weber RE. (2007). High-altitude adaptations in vertebrate hemoglobins. *Respir Physiol Neurobiol.* 158:132-142.

- Weiser MG, Fettman MJ, Van Houten D, Johnson L, Garry F. (1992). Characterization of erythrocytic indices and serum iron values in healthy llamas. *Am J Vet Res.* 53: 1776-1779
- Wheeler JC. (1995). Evolution and present situation of the South American Camelidae. *Biol J Linn Soc.* 54: 271-295.
- Wheeler JC. (2006). Capítulo 3: Historia Natural de la Vicuña. En: Investigación, conservación y manejo de las vicuñas - Proyecto MACS. Vila, B. (ed). Proyecto MACS-Argentina-INCO- Unión Europea. Buenos Aires, 208 pp.
- Whitehead CE, Anderson DE. (2006). Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. *Small Ruminant Res* 61: 207–215
- Whitehead, C.E. (2009) Neonatal diseases in llamas and alpacas. *Vet Clin N Am-Food*, 25, (2)367-384
- Winther, L.; Baptiste, K. E.; Friis, C. (2011). Antimicrobial disposition in pulmonary epithelial lining fluid of horses, part III: cefquinome. *J Vet Pharmacol Ther.* 34 (5): 482 - 486.
- Williams JR, Evermann JF, Beede RF, Scott ES, Dilbeck PM, Whetstone CA, Stone DM. (1991). Association of bovine herpesvirus type 1 in a llama with bronchopneumonia. *J Vet Diagn Invest.*3:258-260.
- Wisselink, H. J.; Veldman, K. T; Van den Eede, C.; Salmon, S. A.; Mevius, D. J. (2006). Quantitative susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobial agents licensed in veterinary medicine. *Vet Microbiol.* 113 (1-2): 73 - 82.
- Xie, W., Zhang, X., Wang, T., Du, S., (2013). Pharmacokinetic analysis of cefquinome in healthy chickens. *Brit Poultry Sci* 54, 84–86.
- Yamaguchi K, Jurgens K, Bartes H, Pilper J. (1987). Oxygen transfer properties and dimensions of red blood cells in high altitude camelids, dromedary camel and goat. *J. Comp. Physiol.* 157: 1-9.
- YANG, D. W., CHEN, Z. L., DING, H. Z., FENG, B. Y., WANG, X. Y., & LIANG, Y. L. (2008). Determination of mutant prevention concentration of cefquinome against *Escherichia coli* [J]. *Chin Vet Science*, 2, 021.
- Yuan, L., Sun, J., Wang, R., Sun, L., Zhu, L., Luo, X., Fang, B. & Liu, Y. (2011) Pharmacokinetics and bioavailability of cefquinome in healthy ducks. *Am J Vet Res*, 72, 122–126.
- Ziv, G., Wanner, M., & Nicolet, J. (1982). Distribution of penicillin G, dihydrostreptomycin, oxytetracycline, and chloramphenicol in serum and subcutaneous chamber fluid. *J Vet Pharmacol Ther*, 5(1), 59-69.
- Zhang, X.; Li, J.; Jiang, H.; Shen, J. (2007). Residue depletion of cefquinome in swine tissues after intramuscular administration. *J Agric Food Chem.* 55 (25): 10493 - 10498.
- Zhang, B. X., Lu, X. X., Gu, X. Y., Li, X. H., Gu, M. X., Zhang, N., & Ding, H. Z. (2014). Pharmacokinetics and ex vivo pharmacodynamics of cefquinome in porcine serum and tissue cage fluids. *Vet J*, 199(3), 399-405.

Zhou Y-F, Shi W, Yu Y, Tao M-T, Xiong YQ, Sun J and Liu Y-H (2016) Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Correlation of Cefquinome Against Experimental Catheter-Associated Biofilm Infection Due to *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 6:1513. doi: 10.3389/fmicb.2015.01513

Zonca, A.; Gallo, M.; Locatelli, C.; Carli, S.; Moroni, P.; Villa, R.; Cagnardi, P. (2011). Cefquinome sulfate behavior after intramammary administration in healthy and infected cows. *J Dairy Sci.* 94 (7): 3455 - 3461. [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(11\)00339-0/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(11)00339-0/pdf)

VIII. ANEXO

VIII. ANEXO

Tabla 35: Datos de los diámetros microbiológicos para el análisis de variación intra-día de cefquinoma en suero.

Concentración (µg/ml)	Diámetros (mm)			CV (%)	Media	SD
	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3			
50,000	27,82	29,58	29,36	3,32	28,92	0,96
50,000	29,65	29,89	29,32	0,97	29,62	0,29
50,000	29,79	28,8	28,81	1,95	29,13	0,57
50,000	28,73	29,15	29,3	1,02	29,06	0,30
50,000	28,65	29,36	29,86	2,08	29,29	0,61
50,000	29,58	29,32	29,42	0,45	29,44	0,13
1,000	19,6	20,15	17,68	6,77	19,14	1,30
1,000	19,02	19,92	17,35	6,95	18,76	1,30
1,000	18,55	19,42	17,67	4,72	18,55	0,88
1,000	18,72	19,73	18,25	4,00	18,90	0,76
1,000	17,67	19,9	18,54	6,01	18,70	1,12
1,000	20,15	17,68	19,9	7,07	19,24	1,36
0,125	12,69	10,45	12,05	9,84	11,73	1,15
0,125	12,13	10,58	10,48	8,36	11,06	0,93
0,125	11,03	11,08	10,45	3,23	10,85	0,35
0,125	11,39	11,05	10,49	4,14	10,98	0,45
0,125	11,05	12,05	10,98	5,27	11,36	0,60
0,125	11,49	10,48	11,4	5,03	11,12	0,56

Tabla 36: Datos de los diámetros microbiológicos para el análisis de variación inter-día de cefquinoma en suero.

Concentración (µg/ml)	Diámetros (mm)			CV (%)	Media	SD
	Día 1	Día 2	Día 3			
50,000	29,65	29,94	28,37	2,85	29,32	0,84
50,000	29,79	29,9	28,5	2,65	29,40	0,78
50,000	29,58	29,35	28,17	2,61	29,03	0,76
50,000	29,89	29,58	28,12	3,24	29,20	0,95
50,000	29,15	29,24	29,06	0,31	29,15	0,09
50,000	29,36	29,31	29,14	0,39	29,27	0,12
1,000	19,6	18,61	16,56	8,49	18,26	1,55
1,000	19,02	19,33	16,03	10,05	18,13	1,82
1,000	18,55	19,31	16,56	7,83	18,14	1,42
1,000	18,72	18,93	16,68	6,86	18,11	1,24
1,000	19,92	19,11	17,66	6,06	18,90	1,15
1,000	19,42	17,05	16,92	7,91	17,80	1,41
0,125	12,69	10,56	9,41	15,29	10,89	1,66
0,125	12,13	11,13	9,11	14,26	10,79	1,54
0,125	11,03	11,88	9,27	12,41	10,73	1,33
0,125	11,39	10,65	9,24	10,48	10,43	1,09
0,125	11,05	10,03	10,68	4,88	10,59	0,52
0,125	11,49	10,92	9,51	9,58	10,64	1,02

Tabla 37: Exactitud de la técnica analítica (método microbiológico) para concentraciones de cefquinoma en suero, entre 0,125 a 50 µg/ml

Concentración teórica (µg/ml)	Media Diámetros (mm)	Concentración experimental (µg/ml)	Exactitud (%)
50	28,78	46,60	93,19
25	26,71	23,34	93,36
10	24,46	11,00	109,98
5	21,97	4,77	95,34
1	17,90	1,22	122,09
0,5	15,51	0,55	109,66
0,25	13,13	0,25	99,09
0,125	10,51	0,10	82,47

La concentración experimental (exp.) se calculó despejando el valor de “x” de la ecuación de la ecuación de calibrado $y = 2,987\ln(x) + 17,30$ donde el valor de “y” corresponde a las diámetros de las tablas 42 y 43 este Anexo. Los diámetros correspondientes a cada patrón se expresan en medias con un n= 45 para cada patrón.

Tabla 38: Diámetros obtenidos para suero y líquido tisular por la administración intravenosa de cefquinoma en todos los animales.

CFQ IV - SUERO - ANIMAL A					
MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	28,39	29,45	28,98	28,94	0,53
2	27,89	28,29	29,56	28,58	0,87
3	26,99	28,45	29,04	28,16	1,06
4	27,06	26,77	26,25	26,69	0,41
5	27,02	26,01	25,01	26,01	1,01
6	24,96	26,31	23,07	24,78	1,63
7	23,97	24,01	23,99	23,99	0,02
8	22,2	22,94	23,89	23,01	0,85
9	23,15	20,15	22,69	22,00	1,62
10	20,55	20,52	21,92	21,00	0,80
11	20,07	18,85	19,61	19,51	0,62
12	18,42	18,49	17,51	18,14	0,55
13	15,04	15,22	15,76	15,34	0,37
14	13,78	12,47	13,08	13,11	0,66
15	11,22	11,18	11,05	11,15	0,09
16	ND	ND	ND	-	-
17	ND	ND	ND	-	-

CFQ IV - SUERO - ANIMAL B					
MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	29,12	29,01	28,47	28,87	0,35
2	28,97	27,41	28,19	28,19	0,78
3	28,15	27,1	27,34	27,53	0,55
4	26,57	26,71	26,09	26,46	0,33
5	26,11	25,18	25,61	25,63	0,47
6	25,01	24,37	24,67	24,68	0,32
7	22,87	23,95	23,39	23,40	0,54
8	22,41	22,54	22,08	22,34	0,24
9	21,64	21,12	21,37	21,38	0,26
10	20,44	20,14	20,17	20,25	0,17
11	19,79	19,27	18,04	19,03	0,90
12	17,08	16,42	17,26	16,92	0,44
13	15,14	14,97	15,01	15,04	0,09
14	13,24	12,97	13,26	13,16	0,16
15	10,84	11,97	11,38	11,40	0,57
16	ND	ND	ND	-	-
17	ND	ND	ND	-	-

CFQ IV - SUERO - ANIMAL C

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	29,12	28,27	29,4	28,93	0,59
2	28,65	27,41	28,99	28,35	0,83
3	27,94	29,06	27,05	28,02	1,01
4	28,1	27,45	26,48	27,34	0,82
5	27,01	26,44	25,58	26,34	0,72
6	24,12	24,18	26,27	24,86	1,22
7	22,91	23,45	23,89	23,42	0,49
8	23,94	22,41	22,18	22,84	0,96
9	21,45	22,76	22,15	22,12	0,66
10	20,84	21,1	21,33	21,09	0,25
11	19,47	19,18	19,97	19,54	0,40
12	18,56	18,54	18,24	18,45	0,18
13	16,53	16,51	16,22	16,42	0,17
14	14,84	13,99	15,04	14,62	0,56
15	12,6	13,04	12,04	12,56	0,50
16	ND	ND	ND	-	-
17	ND	ND	ND	-	-

CFQ IV - SUERO - ANIMAL D

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	29,44	27,99	28,49	28,64	0,74
2	26,85	27,8	28,19	27,61	0,69
3	26,93	27,09	26,51	26,84	0,30
4	26,48	25,31	25,89	25,89	0,59
5	24,84	25,07	24,97	24,96	0,12
6	23,98	23,41	27,12	24,84	2,00
7	22,81	23,05	22,91	22,92	0,12
8	21,67	22,74	20,51	21,64	1,12
9	21,54	20,84	19,15	20,51	1,23
10	19,22	18,99	19,44	19,22	0,23
11	17,84	17,49	17,89	17,74	0,22
12	16,61	16,44	15,87	16,31	0,39
13	14,6	14,35	15,07	14,67	0,37
14	12,78	13,91	12,04	12,91	0,94
15	11,45	11,04	10,76	11,08	0,35
16	ND	ND	ND	-	-
17	ND	ND	ND	-	-

CFQ IV - SUERO - ANIMAL E

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	28,5	29,18	28,01	28,56	0,59
2	29,48	26,84	28,14	28,15	1,32
3	28,01	27,97	26,94	27,64	0,61
4	27,56	25,51	26,57	26,55	1,03
5	27,41	25,37	24,04	25,61	1,70
6	23,4	24,87	25,47	24,58	1,07
7	24,09	25,11	21,2	23,47	2,03
8	21,46	23,1	22,37	22,31	0,82
9	22,17	21,04	20,95	21,39	0,68
10	19,51	20,88	19,84	20,08	0,72
11	18,18	18,17	18,11	18,15	0,04
12	17,39	16,11	15,44	16,31	0,99
13	15,42	13,29	14,11	14,27	1,07
14	12,99	11,61	13,11	12,57	0,83
15	11,21	11,06	11,09	11,12	0,08
16	ND	ND	ND	-	-
17	ND	ND	ND	-	-

CFQ IV - SUERO - ANIMAL F

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	28,94	28,79	28,71	28,81	0,12
2	29,44	27,31	26,17	27,64	1,66
3	25,88	27,16	27,99	27,01	1,06
4	25,69	26,77	24,99	25,82	0,90
5	25,98	25,14	24,51	25,21	0,74
6	26,1	23,78	23,17	24,35	1,55
7	22,38	23,08	24,15	23,20	0,89
8	23,62	21,04	21,04	21,90	1,49
9	20,96	20,71	21,04	20,90	0,17
10	19,84	19,37	20,45	19,89	0,54
11	18,53	18,47	17,45	18,15	0,61
12	17,4	16,14	15,87	16,47	0,82
13	14,99	15,44	13,06	14,50	1,26
14	11,09	13,79	12,88	12,59	1,37
15	11,04	10,88	11,34	11,09	0,23
16	ND	ND	ND	-	-
17	ND	ND	ND	-	-

CFQ IV - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL A

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	15,08	15,93	16,09	15,70	0,54
2	20,95	23,01	21,07	21,68	1,16
3	20,13	20,67	19,97	20,26	0,37
4	19,5	19,09	19,32	19,30	0,21
5	17,86	16,26	15,92	16,68	1,04
6	15,5	15,91	14,32	15,24	0,83
7	9,95	9,23	ND	6,39	5,55

CFQ IV - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL B

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	19,04	18,94	18,97	18,98	0,05
2	21,07	22,31	20,02	21,13	1,15
3	20,84	19,99	19,89	20,24	0,52
4	19,41	18,07	18,71	18,73	0,67
5	16,11	16,87	16,98	16,65	0,47
6	14,79	14,45	13,21	14,15	0,83
7	ND	ND	ND	-	-

CFQ IV - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL C

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	19,77	22,18	21,32	21,09	1,22
2	20,33	20,97	20,71	20,67	0,32
3	19,83	21,43	20,11	20,46	0,85
4	18,43	20,87	19,32	19,54	1,23
5	16,93	17,45	17,31	17,23	0,27
6	14,03	14,38	13,92	14,11	0,24
7	ND	ND	ND	-	-

CFQ IV - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL D

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	17,38	14,08	16,32	15,93	1,68
2	19,05	17,91	19,01	18,66	0,65
3	18,7	19,44	18,71	18,95	0,42
4	17,57	19,67	18,71	18,65	1,05
5	15,4	16,99	16,01	16,13	0,80
6	12,74	12,8	12,49	12,68	0,16
7	ND	ND	ND	-	-

CFQ IV - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL E					
MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	19,52	20,85	20,37	20,25	0,67
2	20,61	22,87	21,92	21,80	1,13
3	19,78	22,7	21,39	21,29	1,46
4	19,63	21,64	20,01	20,43	1,07
5	18,55	19,49	18,92	18,99	0,47
6	16,43	17,03	17,01	16,82	0,34
7	ND	ND	ND	-	-

CFQ IV - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL F					
MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	20,01	22,81	23,01	21,94	1,68
2	20,6	24,47	23,42	22,83	2,00
3	18,84	21,54	20,32	20,23	1,35
4	14,93	16,87	15,32	15,71	1,03
5	12,82	15,81	13,97	14,20	1,51
6	10,46	13,94	11,32	11,91	1,81
7	ND	ND	ND	-	-

Tabla 39: Diámetros obtenidos para suero y líquido tisular por la administración intramuscular de cefquinoma en todos los animales.

CFQ IM - SUERO - ANIMAL A					
MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	D.S.
0	ND	ND	ND	-	-
1	18,78	17,68	18,24	18,23	0,55
2	21,49	20,92	21,61	21,34	0,37
3	22,37	22,51	22,14	22,34	0,19
4	23,30	23,35	22,95	23,20	0,22
5	23,91	23,72	23,67	23,77	0,13
6	25,21	24,80	25,39	25,13	0,30
7	26,00	25,67	26,13	25,93	0,24
8	24,33	24,43	24,81	24,52	0,25
9	23,35	23,75	23,81	23,64	0,25
10	22,53	23,09	23,48	23,03	0,48
11	20,67	22,09	22,03	21,60	0,80
12	21,79	21,52	20,07	21,13	0,93
13	20,10	20,03	18,03	19,39	1,18
14	16,36	16,61	14,55	15,84	1,12
15	ND	ND	ND	-	-
16	ND	ND	ND	-	-

CFQ IM - SUERO - ANIMAL B

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	20,72	19,13	19,63	19,83	0,81
2	22,96	21,21	20,75	21,64	1,17
3	24,23	22,32	22,67	23,07	1,02
4	25,62	23,23	23,34	24,06	1,35
5	25,80	23,81	23,99	24,53	1,10
6	26,03	24,81	24,17	25,00	0,94
7	28,96	24,19	24,74	25,96	2,61
8	27,59	23,46	24,74	25,26	2,11
9	26,42	22,00	23,02	23,81	2,31
10	25,62	21,71	22,42	23,25	2,08
11	22,50	19,52	20,21	20,74	1,56
12	19,39	17,34	17,50	18,08	1,14
13	13,99	14,16	16,37	14,84	1,33
14	12,85	12,61	14,52	13,33	1,04
15	ND	ND	ND	-	-
16	ND	ND	ND	-	-

CFQ IM - SUERO - ANIMAL C

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	16,11	19,29	18,28	17,89	1,62
2	17,28	19,54	21,27	19,36	2,00
3	19,85	19,50	22,79	20,71	1,81
4	20,31	20,17	23,24	21,24	1,73
5	21,67	20,97	23,60	22,08	1,36
6	22,23	22,25	23,81	22,76	0,91
7	22,57	22,46	20,50	21,84	1,16
8	21,33	20,01	20,45	20,60	0,67
9	21,55	19,53	21,71	20,93	1,22
10	20,17	18,64	20,26	19,69	0,91
11	18,08	18,21	19,63	18,64	0,86
12	16,59	15,38	14,87	15,61	0,88
13	13,51	13,21	12,91	13,21	0,30
14	11,18	11,04	10,57	10,93	0,32
15	ND	ND	ND	-	-
16	ND	ND	ND	-	-

CFQ IM - SUERO - ANIMAL D

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	19,79	20,42	20,62	20,28	0,43
2	19,88	22,66	21,53	21,36	1,40
3	24,99	20,21	21,50	22,23	2,47
4	23,91	21,74	22,22	22,62	1,14
5	22,85	22,58	22,90	22,78	0,17
6	22,26	22,39	22,20	22,28	0,10
7	22,54	20,55	21,24	21,44	1,01
8	23,45	18,67	19,97	20,70	2,47
9	23,03	17,48	21,23	20,58	2,83
10	19,30	19,63	20,05	19,66	0,37
11	19,91	19,12	19,57	19,53	0,40
12	16,61	17,63	17,41	17,22	0,54
13	16,25	17,00	17,18	16,81	0,49
14	14,34	14,10	14,42	14,29	0,17
15	ND	ND	ND	-	-
16	ND	ND	ND	-	-

CFQ IM - SUERO - ANIMAL E

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	15,80	18,23	15,05	16,36	1,66
2	19,62	20,47	19,75	19,95	0,46
3	22,01	22,19	22,18	22,13	0,10
4	22,07	20,63	26,31	23,00	2,95
5	24,13	22,93	28,97	25,34	3,20
6	24,19	22,74	28,87	25,27	3,20
7	24,15	22,34	28,60	25,03	3,22
8	23,15	22,08	27,67	24,30	2,97
9	22,13	21,21	26,71	23,35	2,95
10	20,39	23,30	23,36	22,35	1,70
11	19,06	22,13	21,75	20,98	1,67
12	17,28	19,69	20,47	19,15	1,66
13	17,42	19,23	20,23	18,96	1,42
14	15,85	16,47	18,33	16,88	1,29
15	ND	ND	ND	-	-
16	ND	ND	ND	-	-

CFQ IM - SUERO - ANIMAL F

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	19,50	23,17	22,96	21,88	2,06
2	21,22	24,93	25,54	23,90	2,34
3	21,73	25,53	26,08	24,45	2,37
4	23,13	26,46	26,78	25,46	2,02
5	24,75	24,70	26,88	25,44	1,24
6	22,44	26,00	29,08	25,84	3,32
7	24,37	23,75	27,54	25,22	2,03
8	23,77	23,52	26,61	24,63	1,72
9	23,13	22,68	25,09	23,63	1,28
10	22,16	21,72	23,36	22,41	0,85
11	19,75	20,11	18,35	19,40	0,93
12	17,00	17,79	16,84	17,21	0,51
13	14,59	15,00	15,33	14,97	0,37
14	12,57	12,95	13,48	13,00	0,46
15	ND	ND	ND	-	-
16	ND	ND	ND	-	-

CFQ IM - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL A

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	11,71	13,29	13,13	12,71	0,87
2	15,04	15,69	18,82	16,52	2,02
3	20,55	20,26	23,44	21,42	1,76
4	22,20	19,71	24,22	22,04	2,26
5	21,99	20,37	23,10	21,82	1,37
6	19,32	20,66	22,32	20,77	1,50
7	11,13	11,13	11,14	11,13	0,01

CFQ IM - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL B

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	16,37	16,69	14,06	15,71	1,44
2	19,32	19,19	18,58	19,03	0,40
3	22,93	23,38	19,80	22,04	1,95
4	20,84	23,25	19,66	21,25	1,83
5	19,86	18,05	17,84	18,58	1,11
6	16,79	15,11	14,30	15,40	1,27
7	12,59	11,39	11,76	11,91	0,61

CFQ IM - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL C

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	14,87	15,17	13,89	14,64	0,67
2	19,63	20,21	19,56	19,80	0,36
3	21,67	21,06	20,06	20,93	0,81
4	21,05	19,58	19,36	20,00	0,92
5	18,19	17,54	17,60	17,78	0,36
6	16,47	16,51	16,90	16,63	0,24
7	11,45	11,34	11,34	11,38	0,06

CFQ IM - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL D

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	14,14	14,18	13,91	14,08	0,15
2	16,71	15,41	15,51	15,88	0,72
3	18,73	17,76	16,78	17,76	0,98
4	16,19	15,81	15,27	15,76	0,46
5	15,73	16,66	16,46	16,28	0,49
6	14,36	15,10	14,34	14,60	0,43
7	11,91	11,24	11,74	11,63	0,35

CFQ IM - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL E

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	16,49	17,19	17,89	17,19	0,70
2	18,71	19,09	19,48	19,09	0,39
3	20,14	21,08	19,44	20,22	0,82
4	18,41	19,83	19,22	19,15	0,71
5	21,87	21,05	19,44	20,79	1,24
6	19,51	19,60	20,14	19,75	0,34
7	14,01	14,72	14,91	14,55	0,47

CFQ IM - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL F

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	13,44	12,54	10,77	12,25	1,36
2	15,70	15,47	15,15	15,44	0,28
3	19,22	16,35	19,37	18,31	1,70
4	18,00	17,79	17,39	17,73	0,31
5	17,43	16,98	17,07	17,16	0,24
6	16,66	14,51	13,47	14,88	1,63
7	9,42	8,61	9,25	9,09	0,43

Tabla 40: Diámetros obtenidos para suero y líquido tisular por la administración subcutánea de cefquinoma en todos los animales.

CFQ SC - SUERO - ANIMAL A					
MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	13,79	13,69	13,73	13,74	0,05
2	14,67	13,67	14,17	14,17	0,50
3	18,46	19,21	18,67	18,78	0,39
4	20,21	20,26	20,17	20,21	0,05
5	22,97	22,93	22,94	22,95	0,02
6	23,19	24,39	24,47	24,02	0,72
7	24,19	24,06	24,53	24,26	0,24
8	24,24	24,64	24,48	24,45	0,20
9	23,94	24,49	24,29	24,24	0,28
10	23,59	23,51	23,49	23,53	0,05
11	21,85	21,98	22,28	22,04	0,22
12	17,47	17,91	17,64	17,67	0,22
13	14,33	14,37	14,19	14,30	0,09
14	13,99	14,15	14,09	14,08	0,08
15	ND	ND	ND	-	-
16	ND	ND	ND	-	-

CFQ SC - SUERO - ANIMAL B					
MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	17,08	17,29	17,21	17,19	0,11
2	17,22	18,51	18,15	17,96	0,67
3	20,9	20,88	20,69	20,82	0,12
4	23,11	23,04	23,09	23,08	0,04
5	24,17	24,66	24,41	24,41	0,25
6	25,01	25,79	25,37	25,39	0,39
7	23,66	24,67	24,49	24,27	0,54
8	23,63	23,76	23,27	23,55	0,25
9	21,21	20,02	21,31	20,85	0,72
10	19,04	18,86	19,01	18,97	0,10
11	13,57	13,34	13,19	13,37	0,19
12	12,34	12,22	12,11	12,22	0,12
13	11,94	11,57	11,59	11,70	0,21
14	11,28	11,17	11,67	11,37	0,26
15	ND	ND	ND	-	-
16	ND	ND	ND	-	-

CFQ SC - SUERO - ANIMAL C

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	15,94	15,32	15,34	15,53	0,35
2	17,27	17,22	17,08	17,19	0,10
3	21,01	19,97	22,15	21,04	1,09
4	22,03	22,19	22,37	22,20	0,17
5	24,02	24,12	24,17	24,10	0,08
6	23,88	23,88	23,87	23,88	0,01
7	23,21	23,31	23,4	23,31	0,10
8	23,31	23,27	23,76	23,45	0,27
9	22,09	22,07	22,13	22,10	0,03
10	20,42	20,07	20,29	20,26	0,18
11	19,78	19,79	19,68	19,75	0,06
12	15,71	15,07	15,51	15,43	0,33
13	15,39	14,52	14,95	14,95	0,44
14	14,96	14,73	14,33	14,67	0,32
15	ND	ND	ND	-	-
16	ND	ND	ND	-	-

CFQ SC - SUERO - ANIMAL D

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	15,69	15,18	15,63	15,50	0,28
2	18,28	18,24	17,66	18,06	0,35
3	23,99	23,15	23,45	23,53	0,43
4	24,24	24,45	24,66	24,45	0,21
5	25,89	25,91	25,97	25,92	0,04
6	25,61	25,65	25,74	25,67	0,07
7	24,73	24,88	24,91	24,84	0,10
8	23,35	22,88	23,17	23,13	0,24
9	22,19	22,14	22,14	22,16	0,03
10	20,79	20,46	20,67	20,64	0,17
11	19,38	19,68	19,21	19,42	0,24
12	18,21	18,23	18,01	18,15	0,12
13	16,93	16,95	16,91	16,93	0,02
14	14,89	15,08	15,03	15,00	0,10
15	ND	ND	ND	-	-
16	ND	ND	ND	-	-

CFQ SC - SUERO - ANIMAL E

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	14,97	14,78	14,94	14,90	0,10
2	17,24	17,29	17,01	17,18	0,15
3	21,29	21,27	21,01	21,19	0,16
4	22,81	22,65	22,37	22,61	0,22
5	24,09	23,74	24,2	24,01	0,24
6	24,16	23,98	24,19	24,11	0,11
7	23,27	24,19	22,35	23,27	0,92
8	22,51	22,52	22,47	22,50	0,03
9	21,09	21,23	22,28	21,53	0,65
10	20,21	20,63	20,12	20,32	0,27
11	18,89	18,93	18,62	18,81	0,17
12	15,88	15,84	15,64	15,79	0,13
13	14,19	14,13	14,09	14,14	0,05
14	13,38	13,16	13,16	13,23	0,13
15	ND	ND	ND	-	-
16	ND	ND	ND	-	-

CFQ SC - SUERO - ANIMAL F

MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
0	ND	ND	ND	-	-
1	14,01	13,78	14,33	14,04	0,28
2	19,49	19,27	18,99	19,25	0,25
3	22,75	22,17	22,45	22,46	0,29
4	24,15	24,18	24,03	24,12	0,08
5	24,82	24,91	24,12	24,62	0,43
6	23,64	23,68	23,79	23,70	0,08
7	21,15	21,34	21,37	21,29	0,12
8	20,07	20,2	19,99	20,09	0,11
9	17,97	17,61	17,87	17,82	0,19
10	17,16	16,89	17,07	17,04	0,14
11	15,21	15,16	15,31	15,23	0,08
12	14,41	14,93	15,19	14,84	0,40
13	13,08	12,79	12,71	12,86	0,19
14	12,31	11,37	12,88	12,19	0,76
15	ND	ND	ND	-	-
16	ND	ND	ND	-	-

CFQ SC - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL A					
MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	12,31	12,41	12,52	12,41	0,11
2	18,97	18,67	18,48	18,71	0,25
3	22,21	22,11	22,79	22,37	0,37
4	23,19	23,09	23,55	23,28	0,24
5	21,35	21,19	21,14	21,23	0,11
6	15,94	15,43	15,93	15,77	0,29
7	14,32	14,15	14,67	14,38	0,27

CFQ SC - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL B					
MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	13,31	12,69	12,97	12,99	0,31
2	18,19	17,91	17,81	17,97	0,20
3	21,09	21,05	21,11	21,08	0,03
4	21,19	21,04	21,09	21,11	0,08
5	19,11	19,36	19,29	19,25	0,13
6	15,29	15,58	15,13	15,33	0,23
7	14,68	14,75	14,57	14,67	0,09

CFQ SC - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL C					
MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	14,06	14,57	14,68	14,44	0,33
2	20,95	20,81	20,87	20,88	0,07
3	23,26	23,25	23,56	23,36	0,18
4	19,48	19,81	19,66	19,65	0,17
5	18,19	17,84	18,17	18,07	0,20
6	14,98	15,39	14,37	14,91	0,51
7	12,12	12,46	12,64	12,41	0,26

CFQ SC - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL D					
MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	13,59	14,59	14,69	14,29	0,61
2	17,33	16,79	16,63	16,92	0,37
3	21,11	21,86	21,69	21,55	0,39
4	23,44	22,38	22,56	22,79	0,57
5	20,43	20,61	20,97	20,67	0,27
6	14,47	15,13	15,96	15,19	0,75
7	13,31	13,06	13,48	13,28	0,21

CFQ SC - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL E					
MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	13,21	12,75	13,41	13,12	0,34
2	17,82	18,15	17,94	17,97	0,17
3	20,94	21,1	21,21	21,08	0,14
4	21,09	21,13	21,01	21,08	0,06
5	19,21	19,42	19,13	19,25	0,15
6	15,01	15,08	15,6	15,23	0,32
7	13,19	13,49	13,26	13,31	0,16

CFQ SC - LÍQUIDO TISULAR - ANIMAL F					
MUESTRA	DIAMETRO 1	DIAMETRO 2	DIAMETRO 3	PROMEDIO	DS
1	13,91	13,76	13,42	13,70	0,25
2	15,13	14,97	14,78	14,96	0,18
3	20,41	20,37	20,09	20,29	0,17
4	19,07	18,97	19,23	19,09	0,13
5	18,11	18,75	18,56	18,47	0,33
6	17,21	17,21	16,97	17,13	0,14
7	13,98	14,19	13,89	14,02	0,15

Tabla 41: Valores de los diámetros del halo de inhibición expresados como media \pm desviación estándar, tras el análisis de diferentes concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) de cefquinoma diluidas en suero. Tablas en el anexo

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Diámetro suero (MEDIA \pm D.E)
50	28,78 \pm 0,78
25	26,71 \pm 1,01
10	24,46 \pm 1,15
5	21,97 \pm 1,37
1	17,90 \pm 1,16
0.5	15,51 \pm 1,12
0.25	13,13 \pm 1,23
0.125	10,51 \pm 1,01

Tabla 42: Concentraciones séricas, por animal, de cefquinoma a los tiempos de extracción que se indican (en horas) tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa

Tiempo (h)	CONCENTRACIÓN SÉRICA (µg/ml)						
	A	B	C	D	E	F	MEDIA ± D.E.
0,00	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
0,03	49,213	48,073	49,048	44,510	43,334	47,117	46,882 ± 2,442
0,10	43,625	38,286	40,393	31,565	37,819	31,848	37,256 ± 4,763
0,20	37,903	30,697	36,128	24,393	31,848	25,792	31,127 ± 5,393
0,33	23,198	21,431	28,837	17,748	22,087	17,298	21,767 ± 4,204
0,50	18,476	16,269	20,633	12,986	16,124	14,119	16,434 ± 2,799
0,75	12,226	11,837	14,025	12,460	11,435	10,587	12,095 ± 1,153
1	9,385	7,712	9,683	6,567	7,877	7,212	8,073 ± 1,224
1,5	6,760	5,408	6,394	4,274	5,348	4,662	5,474 ± 0,961
2	4,816	3,913	5,019	2,928	3,926	3,340	3,990 ± 0,813
3	3,446	2,684	3,555	1,899	2,532	2,376	2,749 ± 0,640
4	2,095	1,786	2,116	1,158	1,329	1,329	1,635 ± 0,420
6	1,324	0,880	1,467	0,717	0,718	0,757	0,977 ± 0,333
8	0,519	0,469	0,745	0,415	0,363	0,391	0,484 ± 0,140
10	0,246	0,250	0,408	0,230	0,205	0,206	0,258 ± 0,076
12	0,128	0,139	0,205	0,125	0,126	0,125	0,141 ± 0,031
24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-

ND: no detectado

Tabla 43: Concentraciones en líquido tisular, por animal, de cefquinoma a los tiempos de extracción que se indican (en horas) tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa

TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN EN LÍQUIDO TISULAR						
	A	B	C	D	E	F	MEDIA ± D.E.
0,5	0,59	1,76	3,56	0,63	2,68	6,76	2,66 ± 2,32
1	4,33	3,6	3,09	1,57	4,51	7,75	4,14 ± 2,06
3	2,69	2,67	2,88	1,74	3,8	2,75	2,75 ± 0,66
6	1,95	1,61	2,12	1,57	2,85	0,52	1,77 ± 0,77
9	0,81	0,8	0,98	0,68	1,76	0,33	0,89 ± 0,48
12	0,5	0,35	0,34	0,21	0,85	0,14	0,40 ± 0,26
24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-

ND: no detectado.

Tabla 44: Concentraciones séricas por animal de cefquinoma a los tiempos de extracción que se indican (en horas) tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intramuscular

Tiempo (h)	CONCENTRACIÓN SÉRICA (µg/ml)						MEDIA ± D.E.
	A	B	C	D	E	F	
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
0,08	1,37	1,15	2,22	2,71	0,73	4,63	2,14 ± 1,42
0,16	3,87	2,12	3,64	3,89	2,42	9,10	4,17 ± 2,53
0,33	5,40	3,42	5,72	5,21	5,03	10,94	5,95 ± 2,57
0,5	7,20	4,76	6,82	5,93	6,74	15,27	7,79 ± 3,77
0,75	8,71	5,57	9,05	6,26	14,76	16,40	10,12 ± 4,46
1	13,76	6,52	11,37	5,29	14,39	17,43	11,46 ± 4,73
1,5	17,99	9,00	8,36	4,00	13,29	14,17	11,13 ± 4,98
2	11,22	7,12	6,16	3,12	10,42	11,64	8,28 ± 3,38
3	8,34	4,38	5,51	2,99	7,58	8,33	6,19 ± 2,24
4	6,81	3,63	4,06	2,20	5,42	5,54	4,61 ± 1,64
6	4,21	1,57	2,86	2,11	3,43	2,02	2,70 ± 0,99
8	3,60	0,64	1,04	0,97	1,86	0,97	1,51 ± 1,10
10	2,01	0,22	0,46	0,85	1,74	0,46	0,96 ± 0,75
12	0,61	0,13	0,22	0,37	0,87	0,24	0,41 ± 0,28
24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-

ND: no detectado.

Tabla 45: Concentraciones en líquido tisular, por animal, de cefquinoma a los tiempos de extracción que se indican (en horas) tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intramuscular

TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN EN LÍQUIDO TISULAR						MEDIA ± D.E
	A	B	C	D	E	F	
0,5	0,55	2,16	0,95	0,35	0,965	0,54	0,92 ± 0,66
1	1,96	6,58	5,33	2,53	1,818	1,57	3,30 ± 2,12
3	10,13	18,01	7,78	4,75	2,654	4,1	7,90 ± 5,64
6	12,49	13,84	5,69	2,43	1,859	3,37	6,61 ± 5,26
9	11,59	5,67	2,71	2,9	3,219	2,78	4,81 ± 3,50
12	8,15	1,95	1,84	1,65	2,273	1,3	2,86 ± 2,61
24	0,32	0,61	0,32	0,52	0,398	0,19	0,39 ± 0,15
36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-

ND: no detectado.

Tabla 46: Concentraciones séricas, por animal, de cefquinoma a los tiempos de extracción que se indican (en horas) tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía subcutanea

Tiempo (h)	CONCENTRACION SÉRICA (µg/ml)						MEDIA ± D.E.
	A	B	C	D	E	F	
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
0,08	0,303	0,963	0,536	0,546	0,447	0,335	0,522 ± 0,238
0,16	0,351	1,247	0,963	1,289	0,961	1,918	1,122 ± 0,514
0,33	1,638	3,243	3,501	8,048	3,675	5,619	4,287 ± 2,237
0,5	2,652	6,918	5,155	10,941	5,911	9,802	6,897 ± 3,060
0,75	6,636	10,786	9,737	17,894	9,442	11,595	11,015 ± 3,768
1	9,477	15,006	9,044	16,471	9,755	8,531	11,381 ± 3,432
1,5	10,257	10,296	7,477	12,474	7,385	3,804	8,615 ± 3,045
2	10,958	8,087	5,597	7,035	5,703	2,542	6,654 ± 2,816
3	10,192	3,280	4,982	5,086	4,121	1,188	4,808 ± 3,000
4	8,048	1,748	2,695	3,059	2,744	0,916	3,202 ± 2,503
6	4,882	0,268	2,271	2,036	1,659	0,500	1,936 ± 1,656
8	1,130	0,183	0,534	1,330	0,603	0,439	0,703 ± 0,437
10	0,366	0,154	0,455	0,884	0,347	0,226	0,405 ± 0,258
12	0,340	0,137	0,414	0,463	0,256	0,181	0,299 ± 0,130
24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-

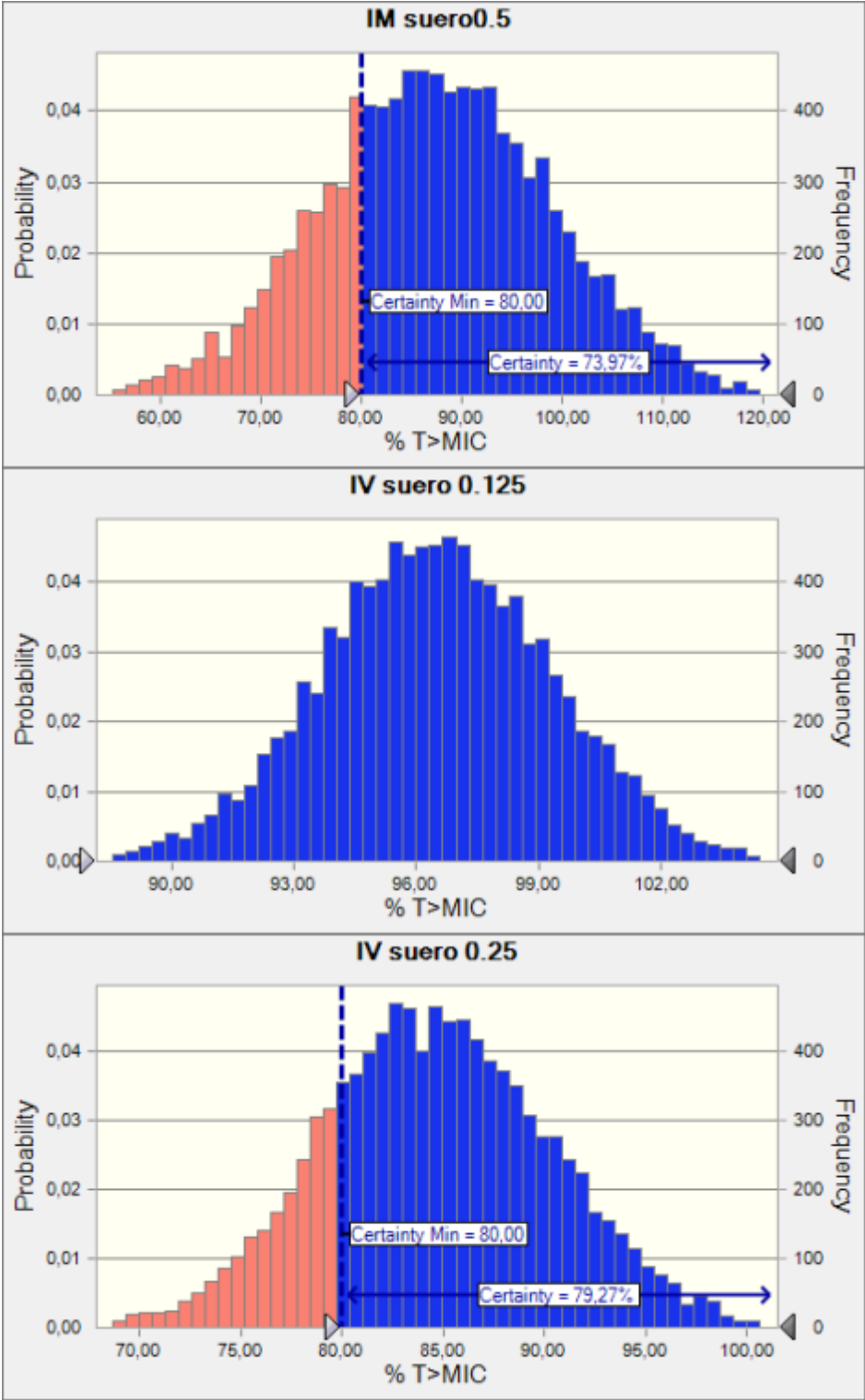
ND: no detectado.

Tabla 47: Concentraciones en líquido tisular, por animal, de cefquinoma a los tiempos de extracción que se indican, en horas, tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía subcutanea

TIEMPO (h)	CONCENTRACIÓN EN LÍQUIDO TISULAR						MEDIA ± D.E
	A	B	C	D	E	F	
0,5	0,195	0,236	0,384	0,366	0,247	0,3	0,288 ± 0,076
1	1,604	1,252	3,32	0,88	1,252	0,457	1,461 ± 0,991
3	5,451	3,55	5,434	4,143	3,55	2,722	4,142 ± 1,105
6	7,392	3,539	2,199	6,283	3,539	1,821	4,129 ± 2,238
9	3,727	1,92	1,295	3,095	1,92	1,481	2,240 ± 0,961
12	0,6	0,517	0,449	0,494	0,501	0,945	0,584 ± 0,184
24	0,376	0,414	0,195	0,26	0,263	0,334	0,307 ± 0,082
36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-

ND: no detectado.

Figura 33: Histograma de frecuencia relativa para el parámetro farmacocinético/farmacodinámico T>CIM 80% para concentraciones inhibitorias mínimas de 0,5; 0,125; 0,25 µg/ml, para las vías intravenosa, intramuscular y subcutanea.



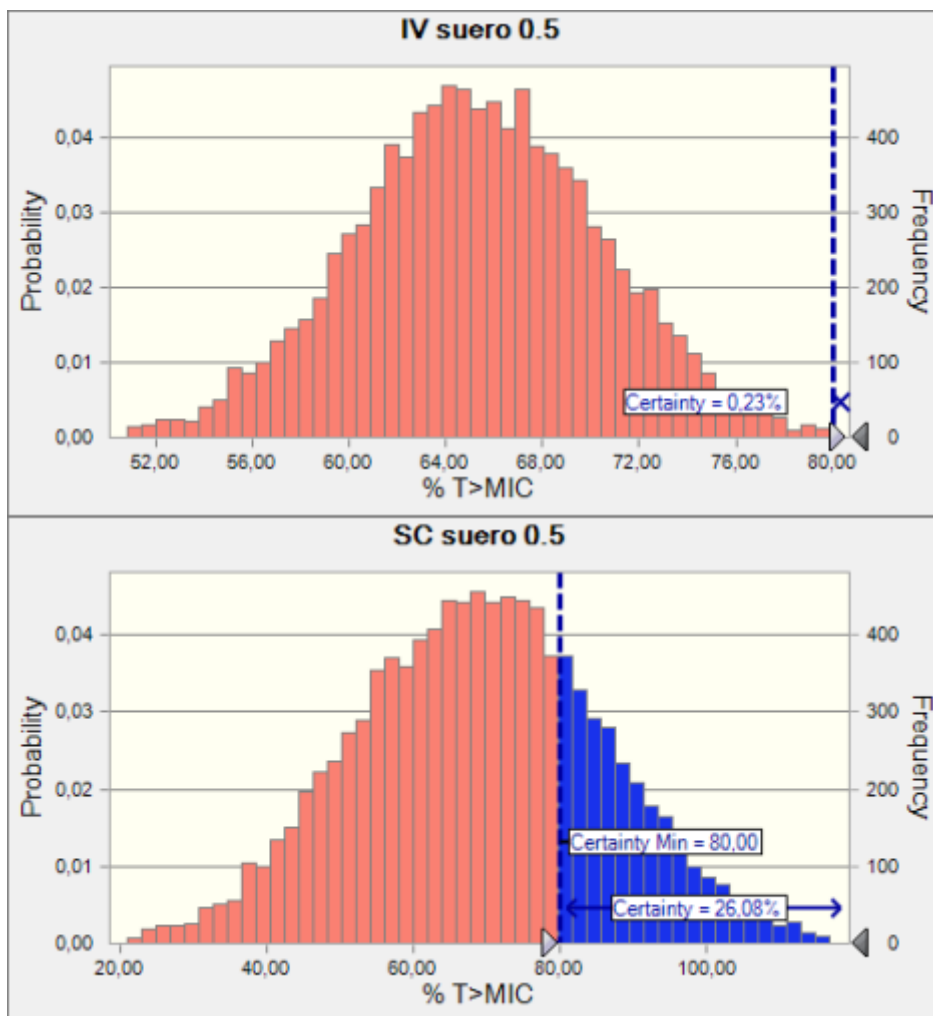
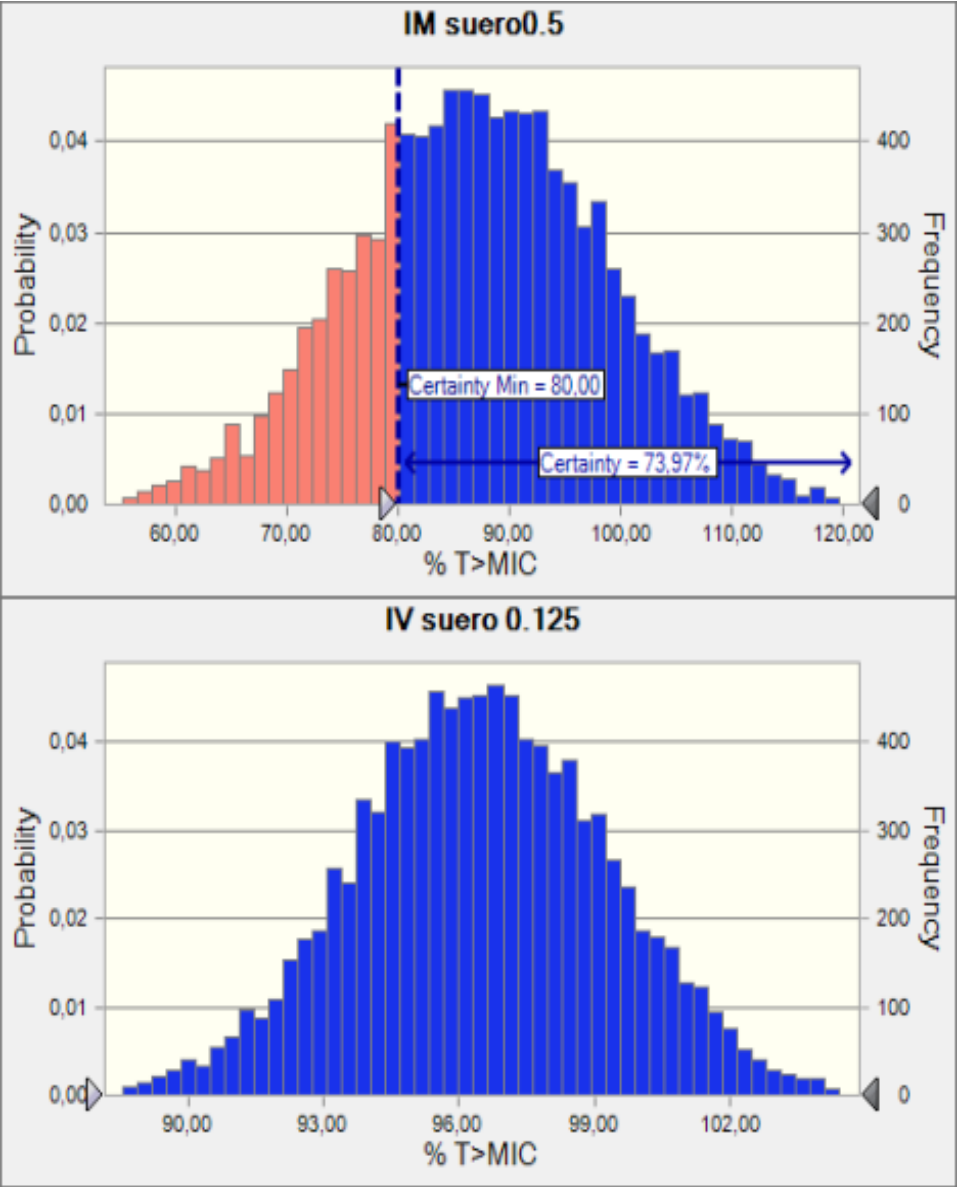


Figura 34: Histograma de frecuencia relativa para el parámetro farmacocinético/farmacodinámico $T > CIM$ 50% para concentraciones inhibitorias mínimas de 0,5; 0,125; 0,25 $\mu\text{g/ml}$, para las vías intravenosa, intramuscular y subcutanea.



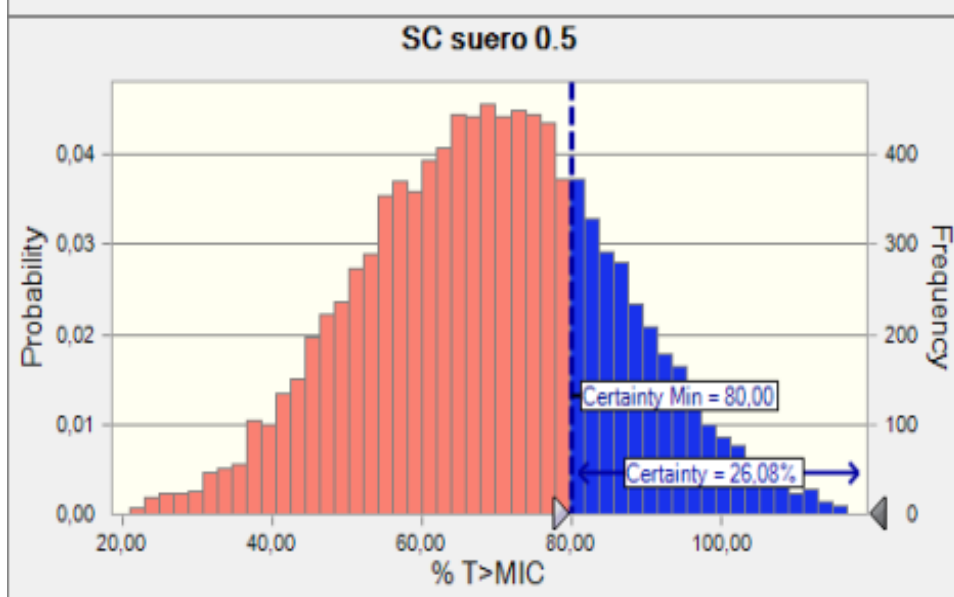
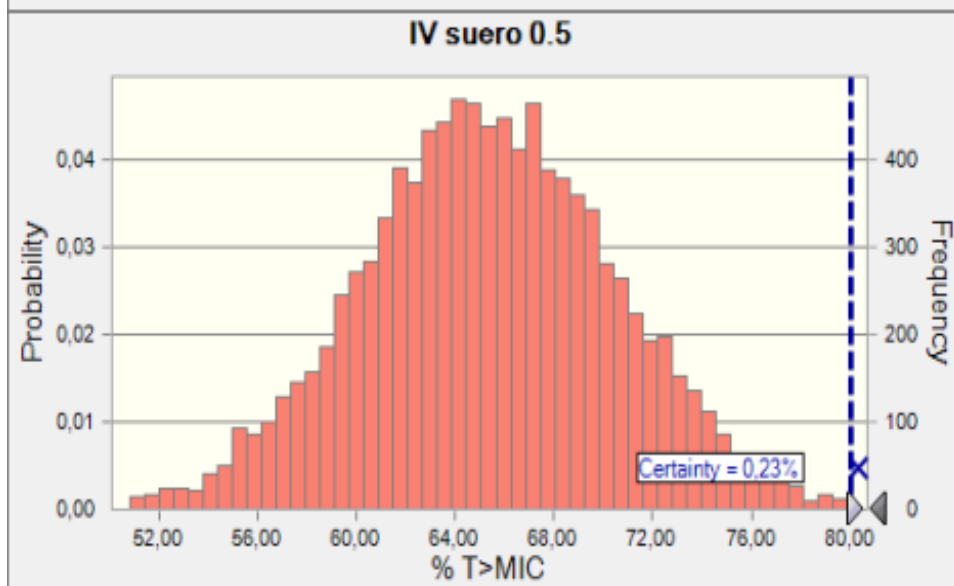
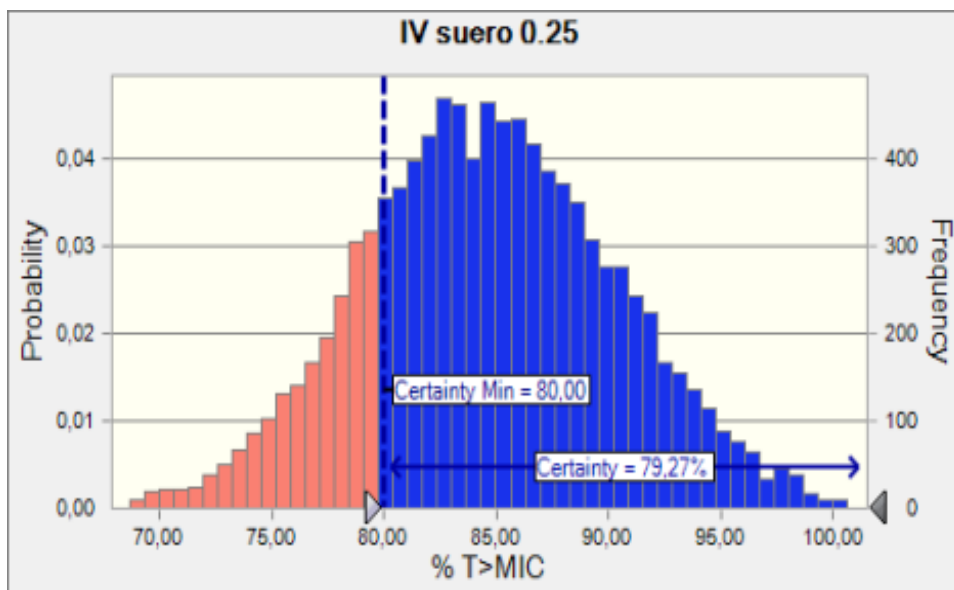


Figura 35: Ejemplo de Planilla para muestreo de farmacocinética de cefquinoma en suero de llamas

FECHA:	VÍA DE ADMINISTRACIÓN: IV - IM -SC
FÁRMACO (genérico y comercial): CFQ (COBACTAN)	DOSIS:
ESPECIE / RAZA:	MUESTRA: SANGRE (SUERO)

ANIMAL Nº			A		B		C		D		E		F	
IDENTIFICACIÓN (CRÓTAL)														
DOSIS TOTAL														
LADO DE ADMINISTRACIÓN (IV)														
ii RECORDAR EXTRAER LA MUESTRA PREVIA A LA ADMINISTRACIÓN ("TIEMPO 0") !!														
VÍA DE ADMINISTRACIÓN			IV		IV		IM		IM		SC		SC	
ANIMAL Nº			A		B		C		D		E		F	
Hora real de administración														
Nº muestra			Horario de extracción		Horario de extracción		Horario de extracción		Horario de extracción		Horario de extracción		Horario de extracción	
-	IM/SC	IV	Teórico	Real	Teórico	Real	Teórico	Real	Teórico	Real	Teórico	Real	Teórico	Real
1	5´	2´												
2	10´	6´												
3	-	12´					-	-	-	-	-	-	-	-
4	20´	20´												
5	30´	30´												
6	45´	45´												
7	60´	60´												
8	90´	90´												
9	2 h	2 h												
10	3 h	3 h												
11	4 h	4 h												
12	6 h	6 h												
13	8 h	8 h												
14	10 h	10 h												
15	12 h	12 h												
16	24 h	24 h												
17	36 h	36 h												
18	48 h	-	-	-	-	-								

Figura 36: Ejemplo de Planilla para muestreo de farmacocinética de cefquinoma en líquido tisular de llamas

FECHA:	VÍA DE ADMINISTRACIÓN: IV- IM - SC
FÁRMACO (genérico y comercial): CFQ (COBACTAN)	DOSIS:
ESPECIE / RAZA:	MUESTRA: LÍQUIDO CAJA TISULAR

[illegible]

IX. RESUMEN

IX. RESUMEN

La cefquinoma es una cefalosporina de 4ª generación de uso exclusivo en medicina veterinaria. Está aprobada para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio en bovinos y cerdos, mastitis aguda y pietin o pederio en bovinos, septicemia de terneros y síndrome metritis-mastitis-agalactia en cerdas. También se ha utilizado para prevenir neumonía severa en lechones (causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Streptococcus pneumoniae*). Además, varios autores recomiendan el uso de cefquinoma en el tratamiento de la diarrea bovina. Posee un amplio espectro de actividad antibacteriana y resistente a las betalactamasas, un factor substancial limitante a la terapéutica con cefalosporinas de generaciones anteriores. Hasta donde conocemos, existen pocos estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos de cefquinoma en llamas que permitan hacer un uso racional.

Los objetivos de esta tesis fueron: estudiar el comportamiento farmacocinético de cefquinoma 2 mg/kg en suero y líquido tisular tras la administración intravenosa, intramuscular y subcutánea en llamas (*Lama glama*); aislar cepas regionales de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, determinar la concentración inhibitoria mínima de cefquinoma para estos patógenos y recomendar una pauta posológica racional basada en un análisis farmacocinético/farmacodinámico mediante simulación de Monte Carlo.

Para ello se dividió el trabajo en cuatro etapas. En la etapa I se realizó la implantación de cajas tisulares y validación de la técnica analítica por método microbiológico para la determinación de cefquinoma en muestras de suero y líquido tisular de llama. En la etapa II se realizó el estudio farmacocinético de cefquinoma tras la administración intravenosa, intramuscular y subcutánea en llamas adultas. Los datos de concentración vs. tiempo de cefquinoma en suero y líquido tisular fueron analizados con un modelo bicompartimental y no compartimental para la vía intravenosa y no compartimental para las vías intramuscular y subcutánea. En la etapa III se realizó muestreo microbiológico, aislamiento y determinación de la concentración inhibitoria mínima de cefquinoma en patógenos regionales por la técnica de microdilución en caldo de acuerdo a las recomendación de CLSI (2009). Por último en la etapa IV se llevó a cabo el análisis farmacocinético y farmacodinámico mediante simulación de Monte Carlo de los esquemas posológicos propuestos. Se simuló una población de 10000 animales, utilizando como punto de corte valores de $T > MIC$ de 50 y 80%.

Tras la cirugía para la administración de las cajas tisulares, se produjo una cicatrización adecuada y sin complicaciones. Al cabo de 10 días se había completado el proceso de cicatrización, sin cuadros de infecciones u otras alteraciones dignas de mención. Se produjo un crecimiento adecuado del tejido de granulación necesario para la obtención del líquido tisular. La técnica microbiológica para la cuantificación de cefquinoma en suero y líquido tisular de llama cumplió con los criterios de validación según los organismos de referencia (VICH, 1998).

Tras la administración de 2 mg/kg por vía intravenosa, intramuscular y subcutánea en llamas adultas, cefquinoma presentó un comportamiento farmacocinético en llamas diferente al descrito para otras cefalosporinas, caracterizado por valores bajos de aclaramiento corporal total ($Cl = 0,054 \pm 0,01 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) y una prolongada permanencia en el organismo con un MRT de

1,70±0,01 sumado a un bajo volumen de distribución ($V_{dss} = 0,10 \pm 0,01 \text{ ml/kg}$). Tras su administración intramuscular y subcutánea la biodisponibilidad absoluta de cefquinoma fue completa (124±45 y 94±35%, respectivamente) siendo estas vías potenciales opciones terapéuticas en esta especie.

La administración de 2 mg/kg de cefquinoma por vía intravenosa, intramuscular y subcutánea presentó un adecuado paso y permanencia del antimicrobiano en el líquido tisular en llamas, siendo mayor tras la administración intramuscular y subcutánea (relación $AUC_{LT}/AUC_{\text{Suero}}$ de 1,98±1,32 y 1,13±0,17, respectivamente; relación $t_{1/2eLT}/t_{1/2e\text{Suero}}$ con valores de 2,27±0,49 para la vía intramuscular y de 3,11±1,11 para la subcutánea; Relación $MRT_{LT}/MRT_{\text{Suero}}$ de 2,30±0,31 para la vía intramuscular y de 2,62±0,85 para la subcutánea y una relación $C_{\text{max}LT}/C_{\text{maxSuero}}$ de 2,06±1,19 para la administración intramuscular y de 0,60±0,35 para la subcutánea). Estos resultados indican que la cefquinoma alcanzaría concentraciones terapéuticas en el tiempo adecuadas en el fluido extracelular de esta especie.

La CFQ, según los resultados de esta tesis, es un ATM eficaz *in vitro* frente a los patógenos aislados en llamas, en el caso de *Escherichia coli* ($n=28$) con unos valores de MIC_{50} 0,031 µg/ml y MIC_{90} 0,063 µg/ml y en el de *Staphylococcus aureus* ($n=35$) con valores de MIC_{50} 0,25 µg/ml y MIC_{90} 0,5 µg/ml. Los resultados de MIC y la distribución unimodal observada para las cepas estudiadas, indicarían una adecuada sensibilidad a la cefquinoma, posiblemente debido a un uso limitado de antimicrobianos en esta especie.

Los resultados del análisis farmacocinético/farmacodinámico mediante simulación de Monte Carlo de un régimen posológico de cefquinoma (2 mg/kg cada 12 horas) tras la administración intravenosa, intramuscular y subcutánea en llamas, indican que el mismo presenta una adecuada eficacia para el tratamiento de infecciones causadas por cepas sensibles de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, con valores de $MIC \leq 0.500 \text{ µg/ml}$.

SUMMARY

Cefquinome is a fourth generation cephalosporin for veterinary use. It is approved for the treatment of respiratory tract infections in cattle and pigs, acute mastitis and foot-root in cattle, calf septicemia and metritis-mastitis-agalactia syndrome in sows. It has also been used to prevent severe pneumonia in piglets (caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Streptococcus pneumoniae*). In addition, several authors recommend the use of cefquinome in the treatment of bovine diarrhea. It has a broad spectrum of antibacterial activity and is resistant to beta-lactamases, a substantial factor limiting the therapeutics with cephalosporins of previous generations. As far as we know there are few pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of cefquinome in llamas that allow for rational use of cefquinome in this specie.

The objectives of this thesis were: to study the pharmacokinetic behavior of cefquinoma (2mg/kg) in serum and tissue cage fluid after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in llamas (*Lama glama*); to isolate regional strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and determine the minimum inhibitory concentration of cefquinome for these pathogens, and to recommend a rational dosing regimen based on a pharmacokinetic / pharmacodynamic analysis using Monte Carlo simulation.

This study was divided in four stages. Stage I, consisted in the implantation of tissue cages and validation of the analytical technique by microbiological method for the determination of cefquinome in serum and tissue cage fluid from llamas. In stage II the pharmacokinetic study of cefquinome after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in adult llamas was performed. The concentration *versus* time profiles of cefquinome in serum and tissue cage fluid were analyzed with a bicompartamental and non-compartmental model for the intravenous route and non-compartmental model for the intramuscular and subcutaneous routes. In stage III, microbiological sampling and isolation of regional *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains were carried out. Determination of the minimal inhibitory concentration of cefquinome was performed by broth microdilution technique according to recommendations of CLSI (2009). Finally in stage IV a pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of the proposed dose regimen was carried out by Monte Carlo simulation. A population of 10000 animals was simulated, using T> MIC endpoints of 50 and 80% of the dose interval.

After surgery of tissue cage implantation, no complications were observed. After 10 days, the healing process had been completed, with no signs of infection or other disorders of note. Adequate growth of the granulation tissue necessary to obtain the tissue fluid occurred. The microbiological technique for the quantification of cefquinome in serum and tissue fluid in llamas complied with the validation criteria according to the reference organisms (VICH, 1998).

After administration of 2 mg/kg by intravenous, intramuscular and subcutaneous route in adult llamas, cefquinome presented a different pharmacokinetic behavior than described for

other cephalosporins, characterized by low values of total body clearance ($CI = 0.054 \pm 0.01$ L*Kg/h), a prolonged permanence in the organism with a MRT of 1.70 ± 0.01 and a low volume of distribution ($V_{dss} = 0.10 \pm 0.01$ ml/kg). After intramuscular and subcutaneous administration the absolute bioavailability of cefquinome was complete (124 ± 45 and $94 \pm 35\%$, respectively), indicating that this routes could be a good choice in this specie.

Intravenous, intramuscular and subcutaneous administration of 2 mg/kg of cefquinome showed an adequate passage and permanence in llama tissue cage fluid, being higher after intramuscular and subcutaneous administration (AUC_{LT}/AUC_{Serum} ratio of 1.98 ± 1.32 and 1.13 ± 0.17 , respectively, $t_{1/2\lambda e_{LT}}/t_{1/2\lambda e_{Serum}}$ with values of 2.27 ± 0.49 and 3.11 ± 1.11 (intramuscular and subcutaneous routes) and MRT_{LT}/MRT_{Serum} ratio of 2.30 ± 0.31 and 2.62 ± 0.85 for the intramuscular and subcutaneous routes, respectively. A $C_{maxLT}/C_{max\ Serum}$ ratio was 2.06 ± 1.19 for intramuscular administration and 0.60 ± 0.35 for the subcutaneous route. These results indicate that cefquinome would achieve adequate therapeutic concentrations in the extracellular fluid in this specie.

The cefquinome, according to the results of this thesis, presented an adequate antimicrobial activity *in vitro* against regional pathogens in llamas. The strains tested were *Escherichia coli* (n=28) with values of MIC_{50} $0.031 \mu\text{g/ml}$ and MIC_{90} $0.063 \mu\text{g/ml}$ and *Staphylococcus aureus* (n=35) with MIC_{50} values of $0.25 \mu\text{g/ml}$ and MIC_{90} $0.5 \mu\text{g/ml}$. Moreover, the unimodal distribution observed for the tested strains showed an adequate antimicrobial sensitivity to cefquinome, possibly due to a limited use of antimicrobials in this specie.

The results of the pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis by Monte Carlo simulation of the proposed dose regimen of cefquinome (2 mg/kg every 12 hours) by intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in llamas, indicate adequate good efficacy for the treatment of infections caused by susceptible strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, with MIC values $\leq 0,500 \mu\text{g / ml}$.